
بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه شهید چمران اهواز**
**دانشکده دامپزشکی**




پایان‌نامه دکتری (**PhD**) بهداشت آبزیان

عنوان:

# بررسی محافظت میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*) در برابر ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از تجویز خوراکی پروتئین نوترکیب VP28کپسوله شده زیستی

اساتید راهنما:

**دکتر رحیم پیغان**
**دکتر مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری**

اساتید مشاور:

**دکتر جاسم غفله مرمضی**
**دکتر محمد افشارنسب**

نگارش:

**دکتر حسین هوشمند**

**خرداد ۱۳۹۳**

**بسمه تعالی**

**دانشگاه شهید چمران اهواز**

دانشکده دامپزشکی

**(نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی دکتری PhD)**

پایان‌نامه‌ی آقای **حسین هوشمند** دانشجوی رشته: **بهداشت آبزیان** از دانشکده **دامپزشکی** به شماره دانشجویی: **۸۹۵۸۹۰۵** تحت عنوان:« **بررسی محافظت میگوی وانامی( *Litopenaeus vannamei*) در برابر ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از تجویز خوراکی پروتئین نوترکیب VP28کپسوله شده زیستی**»، جهت اخذ مدرک: **دکتری(PhD)** در تاریخ: **۱۳۹۳/۰۳/۲۸** توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه: عالی به تصویب رسید.

| اعضای هیأت داوران | مرتبه علمی | سمت | امضا |
|---|---|---|---|
| دکتر رحیم پیغان | استاد | استاد راهنمای اول | |
| دکتر مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری | استاد | استاد راهنمای دوم | |
| دکتر جاسم غفله مرمضی | دانشیار | استاد مشاور | |
| دکتر محمد افشارنسب | دانشیار | استاد مشاور | |
| دکتر مهرزاد مصباح | دانشیار | استاد داور | |
| دکتر بابک محمدیان | دانشیار | استاد داور | |
| دکتر عباس جلودار | دانشیار | استاد داور | |
| دکتر حسین ذوالقرنین | استادیار | استاد داور | |
| دکتر محمد راضی جلالی | استاد | استاد ناظر | |
| دکتر مهرزاد مصباح | دانشیار | مدیر گروه | |
| دکتر بابک محمدیان | دانشیار | | |
| دکتر عبدالرحمن راسخ | استاد | مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه | |

# گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **بررسی محافظت میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*) در برابر ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از تجویز خوراکی پروتئین نوترکیب VP28کپسوله شده زیستی**

اینجانب **حسین هوشمند** دانشجوی **دکتری(PhD)** رشته‌ی **بهداشت آبزیان** دانشکده **دامپزشکی** دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی **۸۹۵۸۹۰۵** تحت راهنمایی **دکتررحیم پیغان** و **دکتر مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری** و مشاوره **دکترجاسم غفله مرمضی** و **دکتر محمد افشارنسب**، گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان‌نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

۴- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

**حسین هوشمند**

**۱۳۹۳/۰۳/۲۸**

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

این پایان نامه را در کمال افتخار تقدیم می نمایم به:

**همسر گرامیم سرکار خانم دکتر مینا آهنگر زاده**

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم بوده و با صبر و تحمل مشکلات مسیر را برایم تسهیل نموده است.

**دختر مهربانم تانیا**

که با صبوری کودکانه اش مشغله کاری و تحصیل پدر را تحمل نموده است.

**پدر و مادرم**

که وجود عزیزشان مایه افتخارم می باشد.

**خانواده محترم همسرم**

که حضورشان برایم منشاء شوق بوده است.

**و همه عزیزانی که یاری و حضورشان همواره امید بخش است.**

## سپاس خدای را


وباسپاس از:

اساتید گرامی جناب آقایان دکتر رحیم پیغان و دکتر مسعود رضا صیفی آبادشاپوری اساتید محترم راهنما، که از راهنمایی های بی دریغ ایشان در انجام این پایان نامه بهره زیادی برده ام.

و

اساتید گرامی جناب آقای دکتر مرمضی و جناب آقای دکتر افشارنسب به دلیل یاری ها ومشاوره های سودمند ایشان

سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر مصباح، جناب آقای دکتر محمدیان، جناب آقای دکتر جلودار و جناب آقای دکتر ذوالقرنین به جهت قبول داوری این پایان نامه و جناب آقای دکتر راضی جلالی به عنوان استاد محترم ناظر.

سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر پیغان، جناب آقای دکتر مصباح و جناب آقای دکتر علیشاهی به خاطر زحماتی که در طول مدت تحصیل متقبل شدند.

باتشکر از:

جناب آقای دکتر مرمضی رئیس محترم پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

جناب آقای دکتر اسکندری معاون محترم پژوهشی وقت پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

جناب آقای دکتر سید مرتضایی معاون محترم پژوهشی پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

همکارانم در بخش بهداشت و بیماری های آبزیان و دیگر بخش های پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور.

وکارشناسان و تکنسین های محترم بخش های آبزیان و ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی.

# فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


چکیده..... ۱
فصل اول: مقدمه و هدف..... ۴
فصل دوم: مروری برمنابع..... ۹
الف- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در استان خوزستان..... ۹
ب- مشخصات، بیولوژی و تکثیر و پرورش گونه سفید غربی..... ۱۱
ج- بیماری‌های میگو..... ۱۴
ج-۱- بیماری‌های باکتریایی:..... ۱۵
ج-۲- بیماری‌های قارچی:..... ۱۷
ج-۳- بیماری‌های انگلی:..... ۱۷
ج-۴- بیماری‌های ویروسی:..... ۱۸
د- بیماری سندروم لکه سفید..... ۲۱
د-۱- ویروس لکه سفید..... ۲۳
د-۱-۱- ژنوم ویروس لکه سفید..... ۲۴
د-۱-۲- میزبانان ویروس..... ۲۸
د-۱-۳- همه گیری شناسی ویروس..... ۲۹
د-۱-۴- انتقال ویروس..... ۳۱
د-۱-۵- بیماری‌زایی و واگیری..... ۳۲
د-۲- علایم بالینی..... ۳۶
د-۳- هیستوپاتولوژی..... ۳۹
د-۳-۱- آسیب شناسی سلولی ویروس لکه سفید..... ۴۰
د-۴- تشخیص بیماری لکه سفید..... ۴۰
د-۴-۱- روش هیستوپاتولوژی..... ۴۱
د-۴-۲- روش‌های سرم شناسی..... ۴۱
د-۴-۳- روش‌های مولکولی..... ۴۲
د-۴-۳-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ۴۲
د-۴-۳-۲- روش In situ hybridization..... ۴۳

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


د-۴-۳-۳- روش Dot blot hybridization ..... ۴۴
د-۵- ایمنی ضد ویروسی ..... ۴۴
د-۶- راهکارهای کنترل و کاهش تلفات ناشی از بیماری لکه سفید ..... ۴۹
د-۶-۱- ایمنی زیستی ..... ۴۹
د-۶-۲- مواد ضد ویروس ..... ۵۰
د-۶-۳- واکسیناسیون یا افزایش مقاومت/قدرت تحمل ..... ۵۲
د-۶-۴- تداخل با ویروس‌های دیگر ..... ۵۴
د-۶-۶- پپتیدهای ضدمیکروبی ..... ۵۵
فصل سوم: مواد و روش کار ..... ۵۸
الف- مواد و روش کار ..... ۵۸
الف-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ..... ۵۸
الف-۱-۱- مواد ..... ۵۸
الف-۱-۲- وسایل مورد نیاز ..... ۶۰
الف-۲- روش تهیه بافرها و محلول های مورد استفاده و مواد تشکیل دهنده آن ها ... ۶۱
الف-۲-۱- روش تهیه محلول تثبیت کننده دیویدسون ..... ۶۱
الف-۲-۲- روش تهیه آب مقطر RNase free ..... ۶۱
الف-۲-۳- تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز ..... ۶۱
الف-۲-۴- روش تهیه بافر TAE ..... ۶۲
الف-۲- ۵- روش تهیه محیط لوریا برتانی (LB) ..... ۶۲
الف-۲- ۶- روش تهیه محلول ۰/۱ مولار IPTG ..... ۶۳
الف-۲- ۷- تهیه محلول های لازم برای SDS-PAGE ..... ۶۳
الف-۲- ۷-۱- روش تهیه محلول ۳۰ درصد اکریل آمید ..... ۶۳
الف-۲- ۷-۲- روش تهیه بافر حرکت دهنده (۵x) ..... ۶۴
الف-۲- ۷-۳-روش تهیه بافر نمونه‌ی ۲ X جهت SDS – PAGE ..... ۶۴
الف-۲- ۷-۴- روش تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو ..... ۶۴

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


الف-۲- ۷-۵- روش تهیه محلول رنگ بر ..... ۶۵
الف-۲- ۷-۶- مواد و مقادیر لازم برای ساخت ژل های جدا کننده و متراکم کننده.... ۶۵
الف-۲-۸- روش تهیه PBS(1X) ..... ۶۷
ب- روش کار ..... ۶۸
ب-۱- مراحل پژوهش ..... ۶۸
ب-۱-۱- نمونه گیری و استخراج دنا ..... ۶۸
ب-۱-۲- استخراج دنا ..... ۶۹
ب-۱-۳- پرایمر ..... ۷۰
ب-۱-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ..... ۷۱
ب-۱-۴-۱- برنامه حرارتی پی‌سی‌آر ..... ۷۱
ب-۱-۴-۲- بررسی محصول پی‌سی‌آر با الکتروفورز در ژل آگارز ..... ۷۲
ب-۱-۴-۳- خالص سازی محصول پی‌سی‌آر ..... ۷۳
ب-۱-۵- تکثیر و خالص سازی وکتور ..... ۷۳
ب-۱-۶- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت ..... ۷۷
ب-۱-۷- مراحل کلونینگ ..... ۷۷
ب-۱-۷-۱- هضم آنزیمی ..... ۷۷
ب-۱-۷-۲-اتصال ..... ۸۰
ب-۱-۷-۳- ترانسفورماسیون ..... ۸۱
ب-۱-۷-۴- غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون ..... ۸۱
ب-۱-۷-۴-۱- غربالگری کلون ها با روش پی‌سی‌آر ..... ۸۲
ب-۱-۸- بررسی بیان پروتئین VP28 ..... ۸۳
ب-۱-۸- ۱- القاء بیان پروتئین با IPTG ..... ۸۳
ب-۱-۸- ۲- SDS-PAGE ..... ۸۴
ب-۱-۸- ۲-۱- آماده سازی قالب ..... ۸۴
ب-۱-۸- ۲-۲- تهیه ژل پلی اکریل آمید ..... ۸۴

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


ب-۱-۸- ۲-۳- آماده سازی نمونه ها و مارکر وزن مولکولی ..... ۸۵
ب-۱-۸- ۲-۴ - آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها ..... ۸۶
ب-۱-۸- ۲-۵- رنگ آمیزی پروتئین های الکتروفورز شده با آبی کوماسی ..... ۸۷
ب-۱-۹- تعیین توالی ژن کلون شده ..... ۸۷
ب-۱-۱۰- تولید ناپلی آرتمیای کپسوله زیستی ..... ۸۸
ب-۱-۱۰- ۱-تولید باکتری TG1 بیان کننده پروتئین GFP ..... ۸۸
ب-۱-۱۰-۲- بررسی بیان پروتئین GFP ..... ۸۸
ب-۱-۱۰-۳- تعیین تراکم باکتری برای خوراندن به ناپلی آرتمیا ..... ۸۸
ب-۱-۱۰-۴- غیرفعال کردن باکتری ..... ۸۹
ب-۱-۱۰-۵- روش تولید ناپلی آرتمیا ..... ۸۹
ب-۱-۱۰-۶-جداسازی و شمارش ناپلی آرتمیا ..... ۹۰
ب-۱-۱۰-۷-تعیین زمان مورد نیاز برای خوراندن باکتری به ناپلی آرتمیا ..... ۹۱
ب- ۱-۱۱- تولید ناپلی آرتمیای نوترکیب ..... ۹۱
ب-۱-۱۲- ایجاد ایمنی در پست لاروهای میگو ..... ۹۲
ب-۱-۱۳-آزمایش چالش ..... ۹۳
ب-۱-۱۳-۱- تعیین تیتر ویروس لکه سفید ..... ۹۳
ب-۱-۱۳-۲- تیمار بندی آزمایش چالش ..... ۹۴
ب-۱-۱۴- روش آسیب شناسی ..... ۹۵
ب-۱-۱۴-۱- ثابت کردن ..... ۹۵
ب-۱-۱۴-۲-آماده سازی بافت و قالب گیری ..... ۹۵
ب-۱-۱۴-۳- مقطع گیری ..... ۹۶
ب-۱-۱۴-۴- رنگ آمیزی ..... ۹۶
ب- ۱-۱۵- آنالیز آماری ..... ۹۸
فصل چهارم نتایج ..... ۱۰۰
الف – تشخیص ویروس لکه سفید در بافت میگوی سفید غربی ..... ۱۰۰

# فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


ب- استخراج توالی ژن پروتئین VP28 ویروس لکه سفید از بانک ژن و طراحی پرایمر .. ۱۰۱
ج – نتایج پی‌سی‌آر برای تکثیر ژن سازنده VP28 ..... ۱۰۲
د– تکثیر و خالص‌سازی وکتور ..... ۱۰۲
هـ– هضم آنزیمی ژن و وکتور ..... ۱۰۳
و – ورود ژن VP28 به داخل وکتور و تأیید صحت آن: ..... ۱۰۳
ز- بررسی بیان پروتئین سازنده VP28 ..... ۱۰۴
ح- تعیین توالی ژن وارد شده به پلاسمید ..... ۱۰۵
ط- بررسی تولید ناپلی آرتمیای حاوی پلاسمید بیان کننده GFP ..... ۱۰۷
ی-تعیین تیتر ویروس مورد نیاز برای چالش ..... ۱۰۸
ک- بررسی ایمن سازی میگوهای سفید غربی ..... ۱۰۹
ل- بررسی هیستوپاتولوژی آزمایش چالش ..... ۱۲۳
فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری ..... ۱۲۷
پیشنهادات: ..... ۱۴۳
منابع: ..... ۱۴۴
چکیده انگلیسی ..... ۱۷۱

# فهرست جداول

**جدول** **صفحه**


جدول ۲-۱- عوامل بیماری‌زای ویروسی میگوهای پنائیده ..... ۱۹
جدول ۳-۱: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل جدا کننده ..... ۶۶
جدول ۳-۲: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل متراکم کننده ..... ۶۶
جدول ۳-۳- مواد و مقادیر استفاده شده در برنامه تکثیر ژن VP28 ..... ۷۱
جدول ۳-۴- برنامه حرارتی PCR ژن VP28 ..... ۷۲
جدول ۳-۵- ترکیبات واکنش هضم مضاعف ژنVP28 ..... ۷۸
جدول ۳-۶- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم Sal I ..... ۷۹
جدول ۳-۷- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم Hind III ..... ۸۰
جدول ۳-۸- ترکیبات واکنش اتصال ژن VP28و پلاسمیدpMal-c2X ..... ۸۱
جدول ۳-۹- مواد و مقادیر استفاده برای تکثیر ژن VP28 ..... ۸۲
جدول۳-۱۰- تیماربندی پست لاروهای مورد آزمایش ..... ۹۴
جدول ۴-۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده درPCR ..... ۱۰۱

# فهرست اشکال

**شکل** **صفحه**


شکل ۲-۱- عکس هوایی از موقعیت مزارع پرورش میگو چوئبده آبادان ..... ۱۰
شکل ۲-۲- نمایی از کارگاه‌های تکثیر میگو منطقه چوئبده ..... ۱۱
شکل ۲-۳ - شکل شماتیک ویروس لکه سفید ..... ۲۴
شکل ۲-۴- ژنوم ویروس لکه سفید جدایه تایلند ..... ۲۸
شکل ۲-۵- بافت‌های هدف اصلی تکثیر ویروس لکه سفید در بدن میگو ..... ۳۴
شکل ۲-۶- لکه های سفید بر روی کاراپاس یک میگوی آلوده به ویروس لکه سفید ..... ۳۷
شکل ۲-۷- قرمزی و تغییر رنگ هپاتوپانکراس در میگوی سفید غربی بیمار ..... ۳۸
شکل ۲-۸- تلفات در کناره استخرهای پرورشی ..... ۳۸
شکل ۳-۱- نقشه پلاسمید pMal-c2X و خصوصیات آن ..... ۷۴
شکل ۳-۲- وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در مارکر وزنی مولکولی به همراه الگوی لکتروفورتیک آن‌ها ..... ۸۶
شکل ۳-۳- هچ کردن سیست های آرتمیا ..... ۹۰
شکل ۳-۴- جداسازی ناپلی های آرتمیای هچ شده ..... ۹۱
شکل ۳-۵- تیماربندی اولیه پست لاروهای میگو ..... ۹۳
شکل ۴-۱- الکتروفورز محصول PCR کیت تشخیص مولکولی Iq2000 ..... ۱۰۱
شکل ۴-۲- الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر ژن VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904 ..... ۱۰۲
شکل ۴-۳- پلاسمید pMal-c2X هضم و خالص شده و پلاسمید هضم نشده ..... ۱۰۳
شکل ۴-۴- الکتروفورز محصول پی سی آر بر روی پلاسمید های نوترکیب موجود در کلونی های باکتری TG1 ..... ۱۰۴
شکل۴-۵- SDS - PAGE القای بیان پروتئینVP28 در باکتری اشریشیاکلی سویه‌یTG1 ..... ۱۰۵
شکل ۴-۶- کروماتوگرام ابتدای ژن VP28 ، محل برش آنزیم Sal I و اتصال به پلاسمید ..... ۱۰۶
شکل ۴-۷- کروماتوگرام انتهای توالی ژن VP28 ، محل برش آنزیم Hind III و اتصال به پلاسمید ..... ۱۰۶
شکل ۴-۸-توالی نوکلئوتیدی ژن سازنده پروتئین VP28 ویروس لکه سفید جدایه ایرانی ثبت شده در بانک ژن با شماره دسترسیAB855742 ..... ۱۰۷
شکل ۴-۹- باکتری TG1پس از بیان پروتئین GFP ..... ۱۰۷
شکل ۴-۱۰- ناپلی آرتمیا ۹۰ دقیقه پس از تغذیه با باکتری حاوی GFP ..... ۱۰۸

# فهرست اشکال

**شکل** **صفحه**

شکل ۴-۱۱- واکوئله شدن سلول های هپاتوپانکراس در میگوهای گروه چالش ..... ۱۲۳
شکل ۴-۱۲ - بروز گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس میگوهای تلف شده ..... ۱۲۴
شکل ۴-۱۳- وجود گنجیدگی در بافت عضله قلب میگوی تلفاتی پس از چالش ..... ۱۲۴
شکل ۴-۱۴- گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس میگوی چالش شده با ویروس لکه سفید ..... ۱۲۵
شکل ۴-۱۵- اپی تلیوم معده، پیکان‌ها گنجیدگی‌ها را نشان می‌دهند ..... ۱۲۵

# فهرست نمودارها

**نمودار** **صفحه**


نمودار ۴-۱- مقایسه تلفات تجمعی رقت‌های متفاوت ویروس..... ۱۰۹
نمودار ۴-۲- مقایسه میزان تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب... ۱۱۰
نمودار ۴-۳- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ..... ۱۱۱
نمودار ۴-۴- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب..... ۱۱۲
نمودار ۴-۵- مقایسه بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ..... ۱۱۲
نمودار ۴-۶- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید..... ۱۱۳
نمودار ۴-۷- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید..... ۱۱۳
نمودار ۴-۸- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های کنترل مثبت در چالش اول ..... ۱۱۴
نمودار ۴-۹- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در چالش اول..... ۱۱۵
نمودار ۴-۱۰- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در چالش اول ..... ۱۱۵
نمودار ۴-۱۱- مقایسه تلفات تجمعی در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش اول ..... ۱۱۵
نمودار ۴-۱۲- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در آزمایش چالش دوم..... ۱۱۶
نمودار ۴-۱۳- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در آزمایش چالش دوم..... ۱۱۷
نمودار ۴-۱۴- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب در آزمایش چالش دوم..... ۱۱۸
نمودار ۴-۱۵- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیر نوترکیب در آزمایش چالش دوم..... ۱۱۸
نمودار۴-۱۶- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید در آزمایش چالش دوم ..... ۱۱۹
نمودار۴-۱۷- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید در آزمایش چالش دوم ..... ۱۲۰
نمودار۴-۱۸- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های کنترل مثبت چالش دوم ..... ۱۲۱
نمودار ۴-۱۹- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در چالش دوم ..... ۱۲۱
نمودار ۴-۲۰- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در چالش دوم ..... ۱۲۲
نمودار ۴- ۲۱- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش دوم..... ۱۲۲

# چکیده


| | | |
|---|---|---|
| **نام خانوادگی:** هوشمند | **نام:** حسین | **شماره دانشجویی:** ۸۹۵۸۹۰۵ |
| **عنوان پایان‌نامه:** بررسی محافظت میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*) در برابر ویروس بیماری لکه سفید با استفاده از تجویز خوراکی پروتئین نوترکیب VP28 کپسوله شده زیستی | | |
| **اساتید راهنما:** دکتر رحیم پیغان و دکتر مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری | | |
| **اساتید مشاور:** دکتر جاسم غفله مرمضی و دکتر محمد افشارنسب | | |
| **درجه تحصیلی:** PhD | **رشته:** بهداشت آبزیان | |
| **دانشگاه:** شهید چمران اهواز | **دانشکده:** دامپزشکی | **گروه:** علوم درمانگاهی |
| **تاریخ فراغت از تحصیل:** خرداد ماه ۱۳۹۳ | **تعداد صفحه:** ۱۷۲ | |
| **کلید واژه‌ها:**لکه سفید، میگوی سفید غربی، پروتئین نوترکیب غشاء، ایمن سازی، کپسوله کردن زیستی | | |

با توجه به نیاز روزافزون جهان به غذاهای با منشاء آبزیان، گسترش آبزی پروری اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد. در این راستا پرورش میگو و دیگر سخت پوستان از اهمیت بسزایی برخوردارند. از طرفی پرورش در سطح وسیع همراه با مدیریت ضعیف و آلودگی آب‌های سطحی منجر به بروز بیماری‌های عفونی می‌شود.

بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در تمامی میگوهای خانواده پنائیده می‌شود. در ایران این بیماری طی سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر استخرها و مزارع منطقه را شدیداً درگیر نموده و کل صنعت پرورش میگو در ایران با خطر تعطیلی مواجه گردید. با توجه به اهمیت بیماری لکه سفید در پرورش میگو، و ضرورت توسعه راهبردهای مناسب در جهت محافظت میگوهای پرورشی و پایدار کردن صنعت پرورش میگو مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان محافظت میگوها در برابر ویروس عامل بیماری لکه سفید با استفاده از باکتری *E.coli* حاوی پروتئین نوترکیب VP28، کپسوله شده زیستی در آرتمیا، طراحی گردید.

بدین منظور ژنوم ویروس از میگوهای بیمار در مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان استخراج و

با پرایمرهای طراحی شده، ژن VP28 تکثیر، خالص و در باکتری TG1 کلون شد. بیان پروتئین بررسی و باکتری غیرفعال شده حاوی پروتئین نوترکیب در ناپلی آرتمیا کپسوله گردید. سپس پست لاروهای مرحله ۵ میگوی سفید غربی به مدت ۵ روز با ناپلی‌های نوترکیب تغذیه شدند و دو بار در روزهای ۷ و ۲۵ پس از شروع تغذیه با ناپلی آرتمیا با ویروس لکه سفید چالش شدند. نتایج نشان داد که در آزمایش چالش اول میانگین درصد تلفات در گروه دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب(pMal+VP28) برابر ۱/۱۱ ± ۱۴/۴۴٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۱/۵۱ ± ۸۰/۳۰٪ بود. در این گروه در تکرارهای مختلف درصد تلفات از ۱۳/۳۳ تا ۱۶/۶۶ و میزان بازماندگی نسبی از ۷۷/۲۷٪ تا ۸۱/۸۱ ٪ متغیر بود. در گروه باکتری حاوی پلاسمید غیر نوترکیب(pMal) میانگین درصد تلفات ۳/۸۴ ± ۳۳/۳۳٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۵/۲۴ ± ۵۴/۵۴٪ بود. در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب(TG1) میانگین درصد تلفات ۵/۸۷ ± ۴۸/۸۸٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۸/۰۱ ± ۳۳/۳۳٪ بود.

در آزمایش دوم چالش پس از گذشت ۵ روز از آزمایش در گروه حاوی پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) تلفات شروع و تا روز ۸ ادامه یافت. در این گروه میانگین تلفات ۱/۹۲ ± ۲۳/۳۳٪ و میانگین میزان بازماندگی نسبی ۲/۵۴ ± ۶۹/۱۱٪ بود.در گروه باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal) میانگین درصد تلفات ۲/۹۳ ± ۴۷/۷۷٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۳/۸۹ ± ۳۶/۷۶٪ بود. در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) میانگین درصد تلفات ۱/۱۱ ± ۷۲/۲۲٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۱/۴۷ ± ۴/۴۱٪ بود.

تأیید آلودگی نمونه‌های تلف شده در آزمایش های چالش از طریق بررسی هیستوپاتولوژی انجام شد. در مقاطع بافتی میگوهای بیمار آلودگی بافت‌های مختلف هپاتوپانکراس، آبشش، معده، قلب و عضلات میگوها به ویروس لکه سفید مشاهده گردید. در هپاتوپانکراس واکوئله شدن بافت و بروز گنجیدگی در بافت همبند و گنجیدگی در بافت‌های عضله، قلب و معده مشاهده گردید.

نتایج این تحقیق نشان داد ایمن سازی با VP28 منجر به تلفات کمتری در مقایسه با گروه‌هایی شد که با پلاسمید غیر نوترکیب واکسینه شده بودند و این نشان دهنده آن است که محافظت ایجاد شده می‌تواند به علت پروتئین نوترکیب باشد.

همچنین محافظت مشاهده شده ناشی از ایمن سازی با پروتئین نوترکیب غشاء احتمالاً فقط به علت وجود پروتئین نوترکیب بوده و اثر هم‌افزایی سلول باکتری بیان کننده پروتئین مطرح نمی‌باشد. زیرا تلفات تجمعی در گروه‌های واکسینه شده با باکتری غیر نوترکیب در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر بوده است.

# فصل اول

## مقدمه وهدف

## فصل اول: مقدمه و هدف

تولید جهانی آبزیان در سال ۲۰۱۰ با افزایش رو به رشد به ۱۴۸/۵ میلیون تن رسید. در حالی‌که از سال ۲۰۰۱ میزان محصولات شیلاتی صید شده در حدود ۹۰ میلیون تن ثابت باقی مانده است، آبزی‌پروری رشد زیادی داشته و با افزایش نرخ متوسط رشد سالانه( ۶/۳٪) از ۳۴/۶ میلیون تن در سال ۲۰۰۱ به ۵۹/۹ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ رسیده است. تولید آبزیان، شامل ۵۶/۴٪ ماهیان آب شیرین (۳۳/۷ میلیون تن)، ۲۳/۶٪ نرم‌تنان (۱۴/۲ میلیون تن)، ۹/۶٪ سخت پوستان ( ۵/۷ میلیون تن)، ۶٪ ماهیان مهاجر (۳/۶ میلیون تن)، ۳/۱٪ ماهیان دریایی ( ۱/۸ میلیون تن) و ۱/۴٪ سایر آبزیان (۰/۸۱۴ میلیون تن) بوده است. در سطح تک گونه‌ای کپور علفخوار با میزان ۴/۳ میلیون تن  از نظر کمی و میگوی سفید غربی با ۱۱/۳ میلیارد دلار از لحاظ ارزش اقتصادی بالاترین رتبه را داشته‌اند. در ایران میزان تولید محصولات شیلاتی از ۶۲۵۵۰ تن (۱/۹ میلیارد دلار) در سال ۲۰۰۱ به ۲۲۰۰۳۴ تن ( ۶/۴ میلیارد دلار) در سال ۲۰۱۰ رسید و از لحاظ رتبه بندی در رتبه ۲۱ جهانی قرار دارد (FAO year book، ۲۰۱۲).

تولید میگوبرای قرن‌ها در بسیاری از کشورها پایدار مانده است. از این‌رو پرورش میگو به یک بخش مهم از صادرات به منظور کسب درآمد و ارزآوری تبدیل شده و این موفقیت، بسیاری از کشورها را تشویق به ورود به عرصه پرورش صنعتی میگو برای صادرات نمود (Bardhan، ۲۰۰۶؛ FAO، ۲۰۰۶).

پرورش میگو با افزایش سهم تولید از ۶٪ در سال ۱۹۷۰ میلادی به ۶۹٪ در سال ۲۰۰۴ رسید و به یک صنعت توسعه یافته تبدیل شد ( FAO، ۲۰۰۶؛ Rosenberry، ۲۰۰۲). ۱۵٪ از ارزش کل محصولات شیلاتی در سال ۲۰۰۹ مربوط به میگو بوده است. میزان تولید میگوی سفید غربی از ۴۷۵۳۶۳ تن (۲/۳ میلیارد دلار) در سال ۲۰۰۰ به ۲۷۲۰۹۲۹ تن (۱۱/۳ میلیارد دلار) در سال ۲۰۱۰ رسید. پرورش میگو منبع اصلی درآمد برای پرورش دهندگان کوچک به حساب می‌آید و نقش بالقوه‌ای را در کاهش فقر در کشورهای درحال توسعه در روستاهای کوچک ساحلی ایفا می‌کند(Adger، ۱۹۹۸؛ Lewis وهمکاران، ۲۰۰۳).علاوه بر این پرورش میگو نقش مهمی در اقتصاد ملی کشورهای آسیای جنوب شرقی، مرکز و جنوب قاره آمریکا داشته و دارد (Walker و Mohan، ۲۰۰۹).

بروز بیماری‌های میگو بالاخص بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش میگو در جهان می‌باشد. بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می‌شود.

اولین گزارش از وجود این بیماری و تلفات بسیار بالای آن در مزارع میگو در سال ۱۹۹۲ از استان‌های فوژان وگوانگجو چین به‌عمل آمده است (Witteveldt، ۲۰۰۶). پس از آن به‌تدریج

بیماری در اکثر مناطق دنیا گسترش پیدا کرد.در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۸۱ در منطقه چوئبده آبادان و سپس در سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر در اغلب استخرها و مزارع مشاهده شد و باعث خسارت زیادی به پرورش دهندگان گردید. پس از آن نیز طی سال‌های بعد بیماری به‌طور پراکنده بروز کرده و باعث ضرر و زیان به پرورش دهندگان گردید (افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۵ و ۱۳۸۸؛ سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۷). از نظر انتشار و ایجاد خسارت‌های اقتصادی بیماری لکه سفید مهم‌ترین بیماری میگوهای پرورشی محسوب می‌گردد و تاکنون بیشترین آثار نامطلوب را بر پروش میگو بر جای گذاشته است.تلاش در جهت کنترل بیماری‌های آبزیان از جمله میگو، به دلیل هزینه بر بودن کاهش تراکم و تجهیزات مورد نیاز جلوگیری از ورود عوامل بیماری به داخل مزرعه معمولاً صورت نپذیرفته و اقتصادی نیز نمی باشد (Jha و همکاران، ۲۰۰۶b). بنابراین محققین غالباً بر کاربرد روش‌های دیگر کنترل بیماری‌ها مانند ایمن سازی تأکید دارند. یقیناً تحریک سیستم ایمنی از طریق واکسیناسیون راهکاری بسیار مطمئن و کارآمد برای مقابله با بیماری‌های آبزیان می‌باشد.

در خصوص سخت پوستان از جمله میگو ، عموماً اعتقاد بر این بود که این موجودات دارای ایمنی اکتسابی نیستند و در نتیجه راهکار واکسیناسیون نمی تواند برای کنترل بیماری‌های آن مؤثر باشد. اخیراً محققین نشان داده‌اند که با استفاده از پروتئین‌های غشای ویروس بیماری لکه سفید می‌توان پاسخ ایمنی و محافظت مناسبی را در برابر بیماری لکه سفید در میگوها ایجاد نمود (Dehghan و همکاران، ۲۰۱۱). Witteveldt و همکاران (b ۲۰۰۴) واکسیناسیون میگوهای ببری سیاه و ژاپنی را با استفاده از ویبریوی غیرفعال شده مؤثر دانسته‌اند.

همچنین در خصوص ایمنی ضد ویروس لکه سفید فعالیت خنثی‌سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس را از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت مشاهده نموده‌اند. این نتایج سبب شده است که محققین به این فرضیه که القاء پاسخ ضد ویروس و شاید واکسیناسیون بر علیه ویروس روش مناسبی باشد، بیشتر توجه کنند (Witteveldt و همکاران،b ۲۰۰۴). بر همین اساس و با توجه به اهمیت این ویروس برای صنعت پرورش میگو تاکنون تحقیقات متعددی در جهت ساخت واکسن بر ضد این ویروس انجام شده است. در این تحقیقات آنتی‌ژن‌های سطحی VP19 و VP28 که در واکنش اولیه ویروس با سلول‌های میزبان نقش دارند مورد توجه قرار گرفته و به ویژه پروتئین VP28 به‌عنوان کاندید ساخت واکسن نوترکیب مطرح شده است (Yi و همکاران، ۲۰۰۴).

در راستای تحقیقات ذکر شده، مطالعه حاضر در جهت امکان دستیابی به اهداف زیر طراحی و اجرا گردید:

- بررسی امکان محافظت میگوها در برابر ویروس عامل بیماری لکه سفید با استفاده از باکتری *E coli* حاوی پروتئین نوترکیب VP28، کپسوله شده زیستی در آرتمیا.
- **تعیین توالی ژن** VP28 **ویروس لکه سفید جدایه استان خوزستان.**
- فراهم نمودن پروتئین غشای ویروس جهت انجام مطالعات بعدی بدون نیاز به ویروس.

**حسین هوشمند**

**خرداد ماه ۱۳۹۳- اهواز**

# فصل دوم

# مروری بر منابع

# فصل دوم: مروری برمنابع

## الف- تاریخچه تکثیر و پرورش میگو در استان خوزستان

در سال ۱۳۷۱ پس از مطالعات فراوان برای انتخاب محل مناسب ، در منطقه قفاس (در سواحل رودخانه بهمنشیر) سه استخر ۰/۵ هکتاری طراحی و ساخته شد. در همان سال برای اولین بار در کشور با ورود ۳۰۰۰۰۰ قطعه میگوی ببری سیاه[1] از کشور مالزی عملیات پرورش با موفقیت انجام گردید و تولیدی حدود ۲۱۰۰ کیلو گرم در هکتار حاصل شد. نظر به موفقیت‌آمیز بودن پرورش میگو، در سال ۱۳۷۲ پس از بررسی‌های زیاد به منظور توسعه، ۵۰۰۰ هکتار از اراضی ملی بخش چوئبده آبادان در نظر گرفته شد. مجتمع پرورش میگو چوئبده آبادان در ۶۰

1 . *Penaeus monodon*

کیلومتری جنوب شرقی آبادان و در فاصله ۱۰ کیلومتری خلیج فارس بین عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و طول جغرافیایی۴۸ درجه در ناحیه‌ای مسطح واقع شده است. این منطقه به پنج قطعه بزرگ ۱۰۰۰ هکتاری تقسیم شده است که هر کدام از قطعات توسط یک کانال با استفاده از مد، از رود خانه بهمنشیر آبگیری می‌شوند (شکل ۲-۱).




**شکل ۲-۱- عکس هوایی از موقعیت مزارع پرورش میگو چوئبده آبادان**

**Google Earth 5.2.1.1329(beta)**

مجتمع تکثیر میگو چوئبده نیز مشتمل بر ۹ باب سوله هریک با ظرفیت اسمی ۲۰ میلیون قطعه بچه میگو در حاشیه جنوب شرقی رودخانه بهمنشیر در مجاورت روستای چوئبده قرار گرفته است. این مجتمع همچنین در کنار دو خور بزرگ جزیره آبا دان (خور گوبان و کویرین ) تأسیس شده است. منبع آب شور این هچری‌ها کانالی است به طول تقریبی ۶ کیلو متر که از خور کویرین به سمت محل احداث کارگاه‌ها حفر گردیده و تا منتهی الیه این مجتمع مقابل کارگاه ۹ امتداد یافته است(شکل ۲-۲)( صنعت میگو در استان خوزستان).



**شکل ۲-۲- نمایی از کارگاه‌های تکثیر میگو منطقه چوئبده**

( اقتباس از سیدمرتضایی و همکاران، ۱۳۸۸)

تا سال ۱۳۸۳ گونه میگوی پرورشی در استان خوزستان، میگوی سفید هندی[1] بود اما با بروز بیماری ویروسی لکه سفید در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ درخوزستان و سال ۱۳۸۴ در بوشهر گونه سفید غربی[2] از سال ۱۳۸۳ توسط مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور به صنعت تکثیر و پرورش ایران معرفی گردید (سید مرتضایی و همکاران، ۱۳۸۸)

## ب- مشخصات، بیولوژی و تکثیر و پرورش گونه سفید غربی

میگوهای خانواده پنائیده[3] متعلق به راسته ده پایان بوده و حدود ۱۱۰ گونه از این خانواده در دنیا وجود دارد. تنها ۱۰ گونه از این خانواده ارزش تجاری داشته که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از

1. *P. indicus*
2. *L.vannamei*
3. Penaeids

میگوی ببری سیاه، میگوی سفید غربی و میگوی چینی[1]. میگوی سفید غربی امروزه مهم‌ترین گونه پرورشی در آمریکای جنوبی و مرکزی و همچنین در آسیای جنوب شرقی می‌باشد.

این میگو، بومی سواحل اقیانوس آرام در کشور مکزیک، مرکز و جنوب آمریکا تا جنوب پرو است که دمای آب این مناطق در تمام طول سال به‌طور طبیعی بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Wyban و Sweeny ، ۱۹۹۱ و Rosenberry، ۲۰۰۲). اولین پرورش آزمایشی میگوهای خانواده پنائیده در اوایل دهه ۱۹۷۰ هنگامی‌که محققین فرانسوی در تاهیتی تکنیک‌های پیشرفته‌ای را برای تولید متراکم و پرورش میگوهای ببری سیاه، سفید غربی و ژاپنی[2] به‌کار بردند، شروع شد. در اواخر دهه‌های ۱۹۷۰ و۱۹۸۰ میگوی سفید غربی از گستره طبیعی خودش در سواحل اقیانوس آرام به آمریکای لاتین از مکزیک تا پرو منتقل شد.

معرفی میگوی سفید غربی به آسیا در سال ۷۹-۱۹۷۸ شروع شد، ابتدا به فیلیپین و در سال ۱۹۸۸ به چین منتقل و فقط چین توانست آن را در حد صنعتی تولید کند. لیکن اولین محموله تجاری عاری از هر گونه ویروس مولدین سفید غربی از آمریکا به آسیا، (هاوایی به تایوان) در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت. این معرفی از چین و تایوان آغاز و سپس تا فیلیپین، اندونزی، ویتنام ، تایلند، مالزی و هند گسترش یافت (wyban، ۲۰۰۳).

میگوی سفید غربی دارای رنگ سفید متمایل به خاکستری بوده، دارای ۸ تا ۱۰ دندان یا خار در قسمت پائینی روسترم و تعداد ۱ تا ۳ خار یا دندان در قسمت بالای روستروم می‌باشد.

1. *P. chinensis*
2. *P. japonicus*

این گونه به زیر گروه لیتوپنئوس[1] تعلق دارد و از مختصات جنس ماده آن، تلیکوم[2] باز بوده و فاقد صفحه رویی و گیرنده کیسه اسپرم[3] می‌باشد ( Wyban و Sweeney، ۱۹۹۱).

این میگو در بسترهای گلی تا اعماق ۷۵ متر زندگی می‌کند و حداکثر وزن این گونه در جنس ماده به حدود ۱۲۰ گرم می‌رسد، جنس نر معمولاً کوچک‌تر می‌باشد.تخم ریزی این میگو در دریا با وارد کردن اسپرم جنس نر درون مجرای تلیکوم انجام می‌شود. جنس ماده اسپرم‌ها را تا زمان تخم ریزی و یا تا زمان پوست اندازی با خود حمل نموده و معمولاً در طی یک ساعت تخم‌ها در هنگام شب بارور می‌شوند. اندازه تخم‌های بارور ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرون بوده و در سطح آب شناور می‌باشند تا به ناپلی تبدیل شوند. این میگو دارای شش مرحله ناپلی، سه مرحه زوآ و سه مرحله مایسیس بوده سپس به پست لارو تبدیل می‌شود. در کلیه این مراحل میگوها حالت پلانکتونی داشته و در سطح آب شناور می‌باشند و معمولاً از زئوپلانکتون‌ها و جلبک‌ها تغذیه می‌کنند. مراحل لاروی معمولاً حالت تغذیه فیلتر کننده[4] داشته ولی چهارمرحله اول ناپلی معمولاً تغذیه نمی‌کنند.

پست لاروها سپس در رسوبات بستر در سواحل قرار گرفته و زندگی کفزی خود را شروع می‌کنند. میگوهای جوان[5] در کناره ساحل رشد کرده در بسترهایی با حالت مانگرو و یا شنی یا در خورها به حیات خود ادامه می‌دهند. در این محل‌ها معمولاً تغییرات مختلف شوری و در جه حرارت را طی نموده و به صورت دسته جمعی زندگی می‌کنند. غالباً از مواد پلانکتونی تغذیه می‌کنند. این میگوها از آنتن‌ها و یک جفت پای اول خود جهت دریافت غذا استفاده

1 Litopenaeus
2. Thelycum
3. Seminal receptacle
4. Filtre feeder
5. Juveniles

می‌کنند. غذا به وسیله یک جفت پای اول برداشت شده و وارد دهان می‌شود. اغلب میگوها در ۲۴ ساعت تغذیه می‌کنند و یک زمان استراحت در ساعات تاریکی دارند. مهم‌ترین شکارچیان این میگوها در حالت عادی، سایر گونه‌های میگو، ماهی‌ها، خرچنگ‌ها و یا لاک‌پشت‌ها می‌باشند (Wyban و Sweeney، ۱۹۹۱).

## ج- بیماری‌های میگو

پرورش میگو در سطح وسیع همراه با مدیریت ضعیف به سرعت منجر به آلودگی شدید در استخرهای میگو شده، در نتیجه محیط مناسبی برای گسترش بیماری‌های باکتریایی و ویروسی فراهم می‌گردد. بیماری‌ها یکی از محدودیت‌های عمده برای افزایش تولید میگو می‌باشد. بیماری‌های میگو را می‌توان به دو دسته عفونی و غیرعفونی تقسیم کرد (Lightner و Redman، ۱۹۹۸). بیماری‌های عفونی توسط ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و یا انگل‌ها ایجاد می‌شوند. عوامل بیولوژیکی مثل فلور میکروبی موجود در استخر، نقش افزایش حساسیت میگوها را به عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند. مدیریت صحیح فلور میکروبی به وسیله اقدامات امنیت زیستی، هوادهی، کم کردن یا حذف عوامل بیماری‌زا و ناقلین آن‌ها، کاربرد پروبیوتیک‌ها، مدیریت لجن کف استخر، مدیریت پساب خروجی، کاهش میزان تعویض آب و ضدعفونی آب ورودی انجام می‌شود. این موارد مهم‌ترین موضوعات در پیشگیری از بیماری‌های میگو می‌باشند (Horowitz و Horowitz، ۲۰۰۱).

**ج - ۱- بیماری‌های باکتریایی:**

باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های میگو می‌توانند بیماری‌زا یا فرصت طلب باشند. در شرایط محیطی نامطلوب برای میگو، باکتری‌های فرصت طلب ممکن است سبب بیماری شوند. عفونت‌های باکتریایی در میگو ممکن است باعث تلفات، ضایعات کوتیکولی، نکروز، کدورت عضلات، رنگ پریدگی آبشش‌ها، رشد آهسته، کوتیکول نرم، روده سفید، بی حالی و کاهش تمایل به گرفتن غذا شوند.

بیماری‌های باکتریایی عمده در میگو، ویبریوزیس[۱]، بیماری باکتریایی رشته‌ای[۲]، عفونت نکروز کننده هپاتوپانکراس[۳]، مایکوباکتریوزیس[۴]، بیماری باکتریایی کیتین پوسته[۵] و عفونت ریکتزیایی[۶] هستند (Goarant و همکاران، ۲۰۰۶؛ Horowitz وHorowitz، ۲۰۰۱؛ Jayasree و همکاران، ۲۰۰۶؛ Lightner ،۱۹۹۶؛ Nunan و همکاران، ۲۰۰۵).

بیماری ویبریوزیس توسط باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس*[۷]، *ویبریو آنگوئیلاروم*[۸]،*ویبریو کامپبلی*[۹]، *ویبریو دمسلا*[۱۰]، *ویبریو هاروئی*[۱۱]، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*[۱۲]، *ویبریو پنائی‌سیدا*[۱۳]، *ویبریو ولنیفیکوس*[۱۴]، *ویبریو نرئیس*[۱۵]، *ویبریو توبیاشی*[۱۶]، *ویبریو*

1.Vibriosis
2.Filamentous bacterial disease
3. NHP
4. Maycobacteriosis
5. Chitinolytic bacterial shell disease
6. Rickettsial infection
7. *Vibrio alginolyticus*
8. *V. anguillarum*
9. *V. campbelli*
10. *V. damsela*
11. *V. harveyi*
12. *V. parahaemolyticus*
13. *V. penaeicida*
14. *V. vulnificus*
15. *V. nereis*
16. *V. tubiashi*

*اسپلندیدوس*[1]، *ویبریو فلوویالیس*[2] و *ویبریو نیگری‌پولچی‌ریتودو*[3] ایجاد می‌شود. عوامل ایجاد کننده بیماری باکتریایی رشته‌ای عبارتند از *فلکسی باکتر*[4]، *سایتوفاگا*[5]، *لوکوتریکس‌موکور*[6] و *تیوتریکس*[7]. عامل بیماری‌زای مسئول بیماری عفونت نکروز کننده هپاتوپانکراس یک *آلفاپروتئوباکتریوم*[8] است. مایکوباکتریوزیس به سبب حضور *مایکوباکتریوم مارینوم*[9]، *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*[10] و دیگر گونه‌های مایکوباکتریوم ایجاد می‌شود. بیماری‌های باکتریایی از بین برنده کیتین پوسته به واسطه باکتری‌های *آئروموناس*[11]، *سودوموناس*[12]، *اسپیریلوم*[13] و بنکا[14] و عفونت ریکتزیایی به وسیله ارگانیسم‌های شبه ریکتزیا[15] ایجاد می‌شود.

بعضی از باکتری‌های گرم مثبت دیگر از قبیل *آئروکوکوس*[16]، *آرتروباکتر*[17]، *باسیلوس*[18]، *کورینه باکتریوم*[19]، *لاکتوباسیلوس*[20]، *میکروکوکوس*[21]، *استافیلوکوکوس*[22] و باکتری‌های گرم منفی *آسینتوباکتر*[23]، *آلکالی‌جنز*[24]، *فلاووباکتریوم*[1]، *موراکسلا*[2]، *کروموباکتریوم*[3]، *اسپیروپلاسما پنائی*[4] نیز به عنوان عوامل بیماری‌زای باکتریایی توصیف شده‌اند.

1. *V. splendidus*
2. *V. fluvialis*
3. *V. nigripulchritudo*
4. *Flexibacter sp.*
5. *Cytophaga sp.*
6. *Leucothrix mucor*
7. *Thiothrix sp.*
8. *Alpha proteobacterium*
9. *Mycobacterium marinum*
10. *Mycobacterium fortuitum*
11. *Aeromonas*
12. *Pseudomonas*
13. *Spirillum*
14 *Benekea*
15. Rickettsia like organisms
16. *Aerococcus*
17. *Arthrobacter*
18. *Bacillus*
19. *Corynebacterium*
20. *Lactobacillus*
21. *Micrococcus*
22. *Staphylococcus*
23. *Acinetobacter*
24. *Alcaligenes*

**ج-۲- بیماری‌های قارچی:**

بیماری‌های قارچی را شاید بتوان یکی از بیماری‌های مهم دوره لاروی میگو در هچری‌ها به حساب آورد. گونه‌های بیماری‌زای عمده *لاژینیدیوم کالینکتس*[5]، *لاژینیدیوم مارینا*[6]، *سیرولپیدیوم*[7]، *لپتولگنیا مارینا*[8]، *فیتیوم*[9]، *هالیفتوروس میلفوردنسیس*[10]، *فوزاریوم سولانی*[11]، *فوزاریوم‌مونیلیفورما*[12] و *فوزاریوم اینکارناتوم*[13] می‌باشند (Alday و Felgel ، ۱۹۹۹؛ Khoa و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lightner، ۱۹۹۶).

**ج-۳- بیماری‌های انگلی:**

بیماری‌های میگوی پنبه‌ای[14]،بیماری گرگارین[15]وآبشش سیاه یا قهوه‌ای[16] به وسیله پروتوزوآهای *زئوتامنیوم*[17]، *اپیستیلیس*[18]، *ورتیسلا*[19]، *آنوفریس*[20]، *آسینتا*[21]، *لاژنوفریس*[22] و *افلوتا*[23]. و مژه‌داران *پارانوفریس*[24] و *پارا اورونما*[25]، تاژکداران: *لپتومونـاس*[26]، کرم‌های حلقوی:

1. *Flavobacterium*
2. *Moraxella*
3. *Chromobacterium*
4. *Spiroplasma penaei sp.*
5. *Lagenidium callinectes*
6. *L. marina*
7. *Sirolpidium spp.*
8. *Leptolegnia marina*
9. *Phythium spp*.
10. *Haliphthoros milfordensis*
11. .*Fusarium solani*
12. *F. moniliformae*
13 *F. incarnatum*
14.Cotton shrimp
15.Gregarine disease
16. Black gill/ brown gill disease
17. *Zoothamnium*
18. *Epistylis*
19. *Vorticella*
20. *Anophrys*
21 .*Acineta* sp.
22. *Lagenophrys*
23. *Ephelota*
24.*Paranophrys* spp.
25. *Parauronema* sp.
26. *Leptomonas* sp.

*نماتوپسیس*[1]، *نماتوپسیس لیتوپنائوس*[2]، *پارافیوایدینا اسکولکوئیده*[3]، *سفالوبولس لیتوپنائوس*[4]، *سفالوبولوس پتی‌تی*[5]، *سفالوایدوفوریده استنائی*[6] و میکروسپوریدین‌ها شامل: *آمسون*[7]، *آگماسوما*[8]، *پلئیستوفورا*[9]، *میکروسپوریدیوم*[10] و هاپلوسپوریدین‌ها ایجاد می‌شوند (Alday و Felgel ، ۱۹۹۹؛ Gopalakrishnan و Parida ، ۲۰۰۵؛ Lightner، ۱۹۹۶).

**ج-۴- بیماری‌های ویروسی:**

ویروس‌ها ساده ترین اشکال حیات هستند که نقش بسیار مهمی در تنظیم فرآیندهای زیستی دنیا دارند. ویروس‌ها اجزاء اصلی شبکه غذای دریایی هستند که بر باکتری‌ها، آرکی‌ها[11] و موجودات یوکاریوتی اثرگذار هستند و نتیجه این اثرگذاری چرخه غذا و انرژی، کنترل تنوع گونه‌ای و تبادل مواد ژنتیکی در بین موجودات دریایی است. بنابراین ویروس‌ها نقش مهمی در چرخه انرژی و بزرگترین مخزن تنوع ژنتیکی در محیط زیست دریایی بازی می‌کنند ( Badhul Haq و همکاران، ۲۰۱۲ ).

ویروس‌ها به عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای میگو مورد توجه هستند.مراحل مختلف زندگی میگوها ممکن است به عفونت ویروسی خاصی حساس باشد که سبب تلفات، رشد آهسته و بدشکلی‌های آناتومیکی شود. تا کنون بیش از ۲۰ ویروس بیماری‌زای میگوها گزارش شده است (جدول۲-۱). (Tan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Walker و Mohan، ۲۰۰۹).

1. *Nematopsis* spp.
2. *N. litopenaeus*
3. *Paraphioidina scolecoide*
4. *Cephalobolus litopenaeus*
5. *C. petiti*
6. *Cephaloidophoridae stenai*
7. *Ameson sp.*
8. *Agmasoma sp.*
9. *Pleistophora sp.*
10. *Microspridium sp.*
11. archaea

عوامل ویروسی بیماری‌زای عمده میگوها شامل ویـروس سـندرم لکـه سـفید[1]، مونـودون باکلوویروس[2]، ویروس سر زرد[3]، ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز[4]، پارووویروس هپاتوپانکراس[5]، باکلوویروس پنائی[6] ، ویروس سندرم تورا[7]، باکلوویروس نکروز غدد روده میانی[8] می‌باشند (Badhul Haq و همکاران، ۲۰۱۲).

**جدول ۲-۱- عوامل بیماری‌زای ویروسی میگوهای پنائیده**

| خانواده | دنا[9] ویروس |
|---|---|
| پارووویریده[10] | ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز (Lightner، ۱۹۹۶)<br>پارووویروس هپاتوپانکراس(Lightner، ۱۹۹۶)<br>ویروس عامل تلفات مولدین(Owens و همکاران، ۱۹۹۸)<br>ویروس شبه پاروو اندام لنفوئیدی (Lightner، ۱۹۹۶) |
| باکلوویریده[12] | باکلوویروس پنائی(Lightner، ۱۹۹۶)<br>مونودون باکلوویروس (Lightner، ۱۹۹۶)<br>باکلوویروس نکروز غدد روده میانی(Lightner، ۱۹۹۶)<br>باکلوویروس پنئوس مونودون تیپ C (Chang و همکاران، ۱۹۹۳)<br>ویروس شبه باکلو غیر مسدود عفونی هموسیت[11] (Owens، ۱۹۹۳) |
| ایریدوویریده[14] | ایریدوویروس میگو[13] (Lightner و Redman، ۱۹۹۳؛ Tang و همکاران، ۲۰۰۷) |
| نیماویریده | ویروس سندروم لکه سفید (Mayo، ۲۰۰۲) |

1. White spot syndrome virus(WSSV)
2.Monodon (MBV)
3. Yellow head virus (YHV)
4. Infectious hematopoietic necrosis virus (IHHNV)
5. Hepatopancreatic parvo virus(HPV)
6. Baculovirus penaei(BP)
7. Taura syndrome virus (TSV)
8. Baculo virus midgut gland necrosis (BMNV)
9 . DNA
10. *Parvoviridae*
11. Hemocyte infecting non-occluded baculo-like virus
12. *Baculoviridae*
13. Shrimp iridovirus (IRIDO)
14. *Iridovidae*

**ادامه جدول ۲-۱- عوامل بیماری‌زای ویروسی میگوهای پنائیده**

| خانواده | رنا[1]ویروس |
|---|---|
| پیکورناویریده[2] | ویروس سندروم تورا (Lightner، ۱۹۹۶) |
| رونی ویریده[3] | ویروس سر زرد (Soowannayan و همکاران، ۲۰۰۳)<br>ویروس مربوط به آبشش(Mayo، ۲۰۰۲)<br>ویروس اندام لنفوئیدی (Spann و همکاران، ۱۹۹۵) |
| رئوویریده[5] | ویروس شبه رئو تیپ ۲ و ۴[4] (Lightner، ۱۹۹۶) |
| رابدوویریده[7] | رابدوویروس میگوهای پنائیده[6] (Lightner، ۱۹۹۶) |
| توگاویریده[9] | ویروس واکوئله کننده اندام لنفوئیدی[8](Lightner، ۱۹۹۶) |
| توتی ویریده[11] | ویروس نکروز عفونی عضلات[10] (Tang و همکاران، ۲۰۰۵) |
| بونیاویریده[13] | ویروس موریلیان[12] (Cowley و همکاران،۲۰۰۵) |
| بدون طبقه بندی | ویروس سندروم رشد آهسته مونودون[14] (Sritunyalucksana و همکاران، ۲۰۰۶) |

همه عوامل بیماری‌زای میگو بسته به اثر بالقوه آن‌ها در ۳ دسته[15] تقسیم‌بندی می‌شوند. ویروس‌های لکه سفید، سرزرد، سندروم تورا، نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز، ویروس عامل تلفات مولدین[16]، ویروس مربوط به آبشش[17]، ویروس اندام لنفوئیدی[18] در دسته۱ (C -1) و ویروس‌های باکلوویروس پنائی، مونودون باکلوویروس، باکلوویروس نکروز غدد روده میانی،

1 .RNA
2. *Picornaviridae*
3. *Roniviridae*
4. Reo-like virus (REO) type II and IV
5 . *Reoviridae*
6 . Rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)
7. *Rhabdoviridae*
8 . Lymphoid organ vacuolization virus (LOVV)
9. *Togaviridae*
10 . Infectious myonecrosis virus (IMNV)
11 . *Totiviridae*
12 . Mourilyan virus (MOV)
13. *Bunyaviridae*
14 . Monodon slow growth syndrome (MSGS)
15. Category
16. Spawner-isolated mortality virus (SMV)
17 Gill associated virus (GAV)
18. Lymphoid organ virus ( LOV)

پاروویروس هپاتوپانکراس، باکتری‌ها، *آلفاپروتئوباکتریوم* و پروتوزوآ، میکروسپوریدین‌ها و هالوسپوریدین‌ها در دسته۲ ( C -2) و انگل‌های گرگارین در دسته۳ (C -3) تقسیم‌بندی می‌شوند.

عوامل بیماری‌زای دسته۱ ممکن است سبب تلفات شدیدی در بیش از یک گونه میگو شوند. عوامل بیماری‌زای دسته ۲ شدت کمتری دارند ولی هنوز جدی محسوب می‌شوند در حالی‌که عوامل بیماری‌زای دسته ۳ دارای کمترین اثر هستند (Lightner، ۲۰۰۵). باکتری‌های دیگر از قبیل ویبریوها شامل این دسته بندی نمی‌شوند زیرا به عنوان فلور میکروبی میگو در دسترس بوده و کیت‌های تشخیصی آن‌ها از جدایه‌های غیر مضر در دسترس نیست. بیماری‌های میگو موجب زیان‌های مهمی در تولید، اشتغال، کاهش درآمد، محدودیت صادرات، ورشکستگی و تعطیلی مشاغل مرتبط و کاهش اعتماد مصرف کننده‌ها شده است (Bondad-Reantaso و همکاران، ۲۰۰۵).

### د- بیماری سندروم لکه سفید[1]

ویروس لکه سفید به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم مورد توجه است. این ویروس کشورهای تولید کننده میگو در آسیا مثل بنگلادش، کامبوج، چین، هند، اندونزی، ایران، ژاپن، کره، مالزی، میانمار، فیلیپین، سریلانکا، تایلند، تایوان، ویتنام و شمال، مرکز و جنوب قاره آمریکا مثل بلیز، برزیل، کلمبیا، اکوادور، گواتمالا، هندوراس، مکزیک، نیکاراگوآ، پاناما، پرو و آمریکا را تحت تأثیر قرار داده است (Bondad-Reantaso و همکاران، ۲۰۰۵؛FAO/NACA ، ۲۰۰۳؛ Lightner، ۱۹۹۶؛Rosenberry ، ۲۰۰۲؛ WB/NACA/WWF/FAO، ۲۰۰۱).

1. White Spot Syndrome Disease

بیماری لکه سفید برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ در تایوان گزارش و باعث خسارت یک میلیارد دلاری در این کشور گردید . سپس بیماری به سایر کشورها از جمله ژاپن ، کره و هندوستان منتقل و در سال ۱۹۹۴ بیماری در تایلند حدود ۵۰۰ میلیارد دلار خسارت ایجاد کرد(تخم افشان و همکاران ،۱۳۸۳ ؛افشارنسب و همکاران ،۱۳۸۵).

بیماری لکه سفید موجب تلفات سنگینی در تمامی میگوهای خانواده پنائیده می‌شود به‌طوری‌که در چین در سال ۱۹۹۲، تایلند طی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۷، ژاپن، تایوان، اندونزی وهند و اکوادور در سال ۱۹۹۹سبب خسارت در تولید، اشتغال و صادرات شده است (Feigon،۲۰۰۰؛ Flegel، ۲۰۰۶ ؛ Huang و همکاران، ۱۹۹۴؛ Rodríguez و همکاران، ۲۰۰۳؛ Takahashiو همکاران، ۲۰۰۰؛ wang وهمکاران، ۱۹۹۵؛ wongteera و همکاران، ۱۹۹۵).

در ایران نیز طی سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر اغلب استخرها و مزارع آلوده و کل صنعت با خطر تعطیلی مواجه و در حدود ۱۰ میلیارد تومان خسارت به پرورش دهندگان وارد گردید ( افشارنسب و همکاران ،۱۳۸۵ ؛ آمار نامه شیلات ایران ۱۳۸۴ )

در سال ۱۹۹۵ بیماری در آمریکا (تگزاس) و در سال‌های ۲۰۰۰ –۱۹۹۹ در طول سواحل اقیانوس آرام از مکزیک تا پرو گسترش یافت (Mohan، ۲۰۰۳).

این بیماری گونه‌های مختلفی از سخت پوستان مانند: میگوی سفید چینی[1]، میگوی سفید هندی[1]، میگوی موزی[2]، میگوی ببری سیاه، میگوی سفید شمالی[3] ، میگوی آبی غربی[4] و میگوی سفید غربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Lo و همکاران،a ۱۹۹۶؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۸).

*1.Fenneropenaeus chinensis*

**د-۱- ویروس لکه سفید**

ویروس نام‌های مختلفی از قبیل باکلوویروس نکروز کننده بافت هیپودرم و خونساز[۵] (Durand و همکاران،۱۹۹۶)، باکلو ویروس غیر مسدود میگوی ببری سیاه [۶] (Wang و همکاران، ۱۹۹۵)، ویروس میله‌ای شکل هسته میگوی کوروما[۷] (Inouye و همکاران، ۱۹۹۴) دنا ویروس میله‌ای شکل پنائیده[۸] (Venegas و همکاران، ۲۰۰۰) باکلوویروس عمومی اکتودرم و مزودرم[۹] ( Wongteerasupayaو همکاران، ۱۹۹۵) یا باکلوویروس لکه سفید[۱۰] (Chou وهمکاران، ۱۹۹۵) داشت که گمان می‌رفت به عنوان عوامل ویروسی مختلف سبب بیماری‌های متفاوتی در نقاط مختلف دنیا می‌شود.سرانجام ویروس لکه سفید توسط کمیته بین المللی طبقه بندی ویروس‌ها[۱۱] به عنوان گونه‌ای از جنس *ویسپوویروس*[۱۲] از خانواده نیماویریده[۱۳] پذیرفته و به رسمیت شناخته شد که دارای ژنومی منحصر بفرد و آسیب شناسی خاص ایجاد بیماری است (ICTV، ۲۰۰۸ ؛ Vlak و همکاران، ۲۰۰۵).

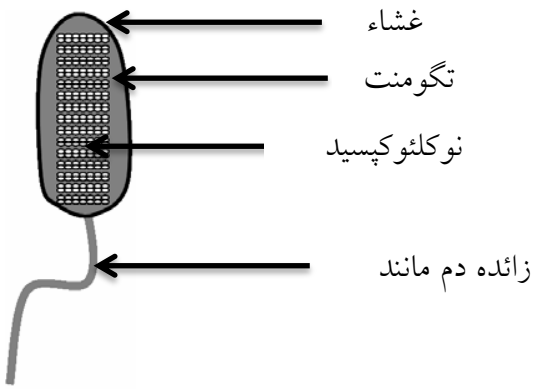
ویروس لکه سفید نام خود را از لکه‌های سفید با قطر ۰/۵ تا ۳ میکرونی جای گرفته روی اسکلت خارجی میگوی آلوده گرفته است (Lo و همکاران، ۱۹۹۶a).به نظر می‌رسد لکه‌های سفید

---

*2.F. indicus*
*3.F. merguiensis*
*4.Litopenaeus setiferus*
*5.L. stylirostris*
6.Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV)
*7.P. monodon* non-occluded baculovirus (PmNOB III)
8.Rod shaped nuclear virus of *Marsupenaeus japonicus* (RV-PJ)
9.Penaeid rod-shaped DNA virus
10.Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV)
11.White spot baculovirus (WSBV)
12.International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)
*13.Whispovirus*
*14.Nimaviridae*

نقاط کلسیفیه شده‌ای هستند که در نتیجه نقص عملکرد درست پوشش خارجی میگو بروز می‌کند (Wang و همکاران، ۱۹۹۹).

ویروس لکه سفید یک ویروس غشاءدار با ژنوم دنا دو رشته‌ای[1]، تخم مرغی تا میله‌ای شکل با یک زائده دم مانند در یک انتها می باشد (Van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱a؛ Yangو همکاران، ۲۰۰۱). شکل شماتیک ویروس در شکل ۲-۳ نشان داده شده است.




**شکل ۲-۳ - شکل شماتیک ویروس لکه سفید**

ویروس لکه سفید برای حداقل ۷۸ گونه از بیشتر سخت پوستان ده پا شامل میگوهای دریایی و آب شیرین، خرچنگ پهن[2]، خرچنگ دراز آب شیرین[3] و لابستر بیماری‌زا است ( Flegel ، ۲۰۰۶؛ Lightner،۱۹۹۶).

### د-۱-۱- ژنوم ویروس لکه سفید

ویروس لکه سفید یکی از بزرگترین دنا ویروس‌هایی است که تاکنون تعیین توالی شده‌اند (Filee و Chandler، ۲۰۰۸). ویریون‌های ویروس بیضی تا میله‌ای شکل بوده و اندازه قابل

1. Double stranded DNA virus
2 .Crab
3 .Crayfish

توجه‌ی دارند. ویریون‌ها ۱۳۸–۷۰ نانومتر در ۳۴۰–۲۴۰ نانومتر اندازه دارند. این ویروس شامل یک نوکلئوکپسید میله‌ای شکل با اندازه ۳۵۰–۲۰۰×۹۰–۷۰ نانومتر است (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wang, Q. و همکاران، a۲۰۰۰).

ویروس دارای یک زائده دم مانند بی‌نظیر در حالت مایع است (دلیل نامگذاری این خانواده، به دلیل وجود زائده دم مانند می‌باشد زیرا نیما[1]به معنی نخ و زائده است). ویریون‌ها شامل یک مولکول دنا دورشته‌ای بزرگ هستند که در یک نوکلئوکپسید میله‌ای شکل همراه با غشاء پیچیده شده است. نوکلئوکپسیدها دارای ظاهر مخطط هستند. ژنوم ویروس در حدود ۱۸۰ رمزگردان[2] ( بسته به واریته ویروس) را رمز گذاری می‌کند (van Hulten و همکاران، a ۲۰۰۱؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۱). در اندازه ژنوم ویروس اختلاف نظر وجود دارد، محدوده‌ای از ۲۹۲۹۶۷ جفت باز مربوط به جدایه تایلند[3] با شماره دسترسی AF369029 در بانک ژن ( van Hulten و همکاران، a۲۰۰۱)، ۳۰۵۱۰۷ جفت باز مربوط به جدایه چین[4] با شماره دسترسی AF332093 در بانک ژن (Yang و همکاران، ۲۰۰۱) تا ۳۰۷۲۸۷ جفت باز مربوط به جدایه تایوان[5] با شماره دسترسی AF440570 در بانک ژن. با این حال توالی‌های به اشتراک گذاشته شده توسط این ژنوم‌ها تقریباً یکسان بوده و همسانی نوکلئوتیدی، ۹۹/۳ درصد می‌باشد. اختلاف اندازه‌ها بیشتر ناشی از چندین حذف و اضافه کوچک در نواحی با تکرارپذیری دنا تا تغییر پذیری ژنتیکی در یک ناحیه حدود ۷۵۰ جفت باز و یک حذف بزرگ با اندازه تقریبی ۱۳ کیلو جفت باز است (تصویر۲–۴) (Marks و همکاران، ۲۰۰۴). یک ویروس با ژنومی حدود ۵ کیلوجفت باز

1. Nima
2 .Open Reading Frame (ORF)
3 .WSSV-TH
4 .WSSV-CN
5 .WSSV-TW

بزرگتر از آخرین جدایه تعیین توالی شده کشف شد. این جدایه ممکن است نیای مشترک بالقوه جدایه‌های ویروس تا سال ۲۰۰۵ محسوب شود (Marks و همکاران، ۲۰۰۵). در مقایسه ویریون ها حداقل ۵۰ پروتئین ساختاری که در سه لایه مجزا از لحاظ ریخت شناسی مرتب شده اند وجود دارد (Li وهمکاران، ۲۰۰۷؛ Tsai و همکاران، ۲۰۰۴). با تأکید بر موقعیت تاکسونومیک ویروس لکه سفید، بیشتر رمزگردان ها در صورت وجود، دارای سطح پائینی از شباهت اسیدآمینه‌ای در مقایسه با پروتئین هایی از دیگر ویروس ها یا موجودات دیگر هستند (Lightner ، ۲۰۰۳؛ Vlak و همکاران، ۲۰۰۵) .

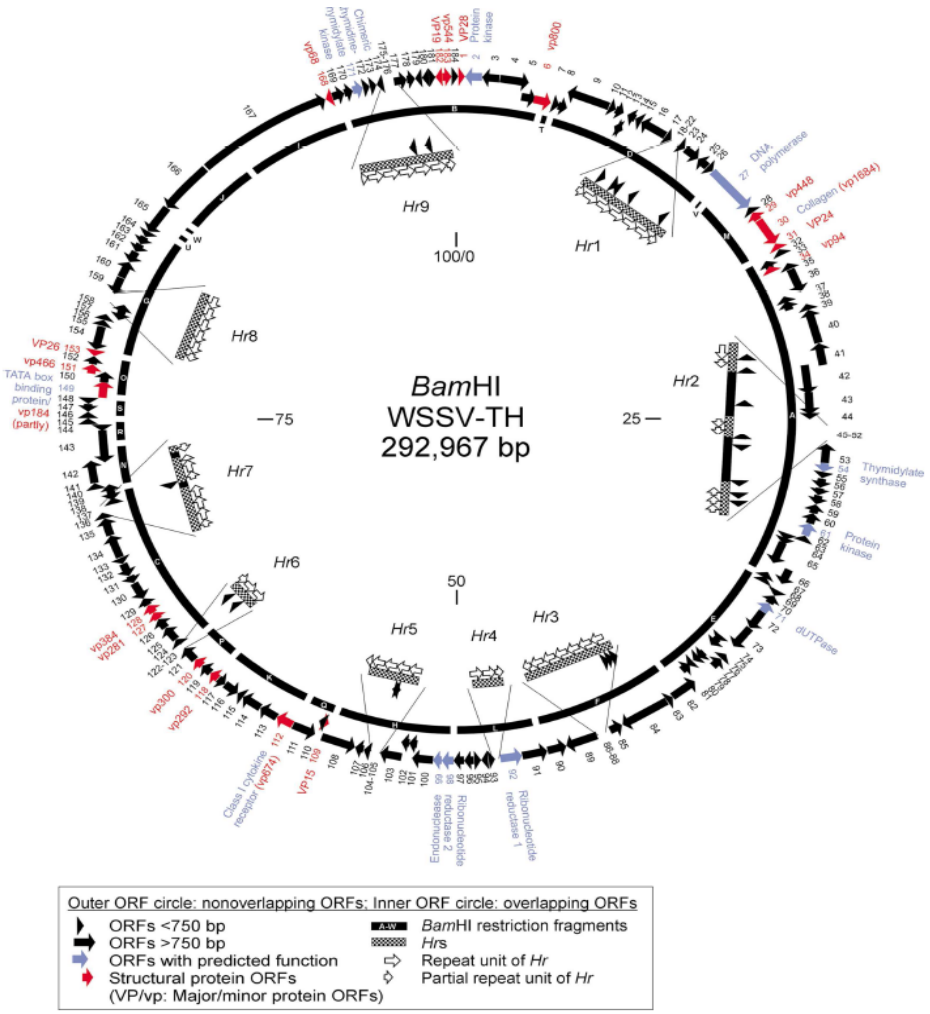
تاکنون جدایه‌های ویروس اختلافات کوچک ژنتیکی و زیستی را در توالی و میزبانی نشان داده‌اند و حدس زده می‌شود که آن‌ها بسیار به هم مرتبط باشند و حتی از یک منبع نشأت می‌گیرند (Lightner ، ۲۰۰۳).

بیش از ۵۰ پروتئین ساختاری و یک پروتئین غیر ساختاری VP9 در ویروس لکه سفید شناسایی شده است (Liu Y.و همکاران، ۲۰۰۶). این پروتئین‌ها را براساس وزن تخمینی آن‌ها در آزمایشات SDS-PAGE یا بر اساس تعداد اسید آمینه پروتئین‌ها نامگذاری کرده‌اند. پروتئین‌های غشاء عبارتند از:VP12، VP19، VP22، VP24، VP28، VP31، VP36B، VP38A، VP39، VP41، VP41A، VP41B، VP51B، VP52A، VP52B، VP53، VP53A، VP68، VP110، VP124، VP150، VP187، VP281، VP292، VP466 (Huang و همکاران، ۲۰۰۲a,b؛ Li, H و همکاران، ۲۰۰۶؛ Li, L.J.و همکاران، ۲۰۰۶؛ Li, L.و همکاران، ۲۰۰۶؛ Tsaiو همکاران، ۲۰۰۴و۲۰۰۶؛ van Hultenو همکاران، ۲۰۰۰و۲۰۰۱bو۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xieو Yang ، ۲۰۰۶؛ Yiو همکاران، ۲۰۰۴؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۲؛ Zhu و همکاران، ۲۰۰۵و۲۰۰۶).

پروتئین‌های نوکلئوکپسید شامل:VP15، VP35، VP51C، VP60B، VP388، VP664، (Leu J.H. و همکاران، ۲۰۰۵؛ Tsaiو همکاران، ۲۰۰۴و۲۰۰۶؛van Hulten و همکاران، ۲۰۰۲؛ Witteveldtو همکاران، ۲۰۰۵؛ Xiao و همکاران، ۲۰۰۶) و پروتئین‌های موجود در تگومنت(پوشش) عبارتند از: VP39A،VP36A وVP95 (Tsaiو همکاران، ۲۰۰۶). موقعیت دیگر پروتئین‌ها ناشناخته بوده و عملکرد بیشتر این پروتئین‌ها به طور کامل روشن نشده است.به نظر می‌رسد VP15 یک پروتئین متصل شونده به دنا است (Witteveldtو همکاران، ۲۰۰۵).

آزمایشات خنثی سازی نشان داده است که پروتئین‌های غشایی VP24، VP28، VP31، VP36B، VP68، VP76، VP281 و VP466 در مراحل اولیه تکثیر ویروس لکه سفید نقش دارند (Huang و همکاران، ۲۰۰۵؛Li H و همکاران، ۲۰۰۶؛ .Li, L.Jو همکاران، ۲۰۰۶؛ .Li, Lو همکاران، ۲۰۰۵؛ van Hultenو همکاران، ۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xieو Yang ، ۲۰۰۶).

پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها (Yiو همکاران،۲۰۰۴) و عفونت عمومی دخالت دارد ( van Hultenو همکاران،۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵). پرایمرهای طراحی شده برای ژن VP28 و آنتی بادی تولیدی بر علیه این پروتئین در تشخیص جدایه‌های متفاوت این ویروس مناسب بوده است (Musthaq و همکاران، ۲۰۰۶؛ Poulos و همکاران، ۲۰۰۱).




**شکل ۲-۴- ژنوم ویروس لکه سفید جدایه تایلند**

### د-۱-۲- میزبانان ویروس

ویروس لکه سفید طیف وسیعی از میزبانان را در بین سخت پوستان ده پا دارا می‌باشد. حداقل ۱۸ گونه میگوی وحشی و پرورشی از خانواده پنائیده، ۸ گونه کاریدین[1]، ۷ گونه لابستر، ۷ گونه از خرچنگ درار آب شیرین و ۳۸ گونه خرچنگ پهن یافت شده‌اند که به ویروس لکه سفید آلوده بوده‌اند (Chou وهمکاران، ۱۹۹۸؛ Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Lightner و همکاران،

1. Caridean

۱۹۹۸؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶b؛ Sahul-Hameed و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه بر این ویروس لکه سفید در ۶ گونه سخت پوست غیر ده پا نیز شناسایی شده است (Hossain وهمکاران، ۲۰۰۱؛ Supamattaya و همکاران، ۱۹۹۸) مثل کرم‌های پیکانی شکارچی[1]، روتیفرها، کرم‌های پرتار[2] و بعضی از لاروهای حشرات آبزی. بعضی از گونه‌های وحشی مثل کرم‌های پرتار را شاید بتوان به عنوان ناقل مکانیکی به حساب آورد که فقط در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ( پی‌سی‌آر)[3] مثبت بوده‌اند (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۸).

**د-۱-۳- همه گیری شناسی ویروس**

رشد سریع صنعت آبزی‌پروری میگوهای پنائیده همراه با افزایش جابجایی میگوهای زنده و مرده آلوده در سطح بین‌المللی به گسترش سریع ویروس کمک کرده و توسعه آبزی‌پروری میگو در سطح جهان را مورد تهدید قرار داده است (Durand و همکاران، ۲۰۰۰). امکان انتقال افقی ویروس از طریق هم جنس خواری و مسیرهای انتقال آب دلیلی بر گسترش سریع ویروس در جمعیت میگوها به شمار می‌رود (Wu و همکاران،۲۰۰۱). همه‌گیری‌هایی از بیماری در آسیا بعد از اولین کشف بیماری در تایوان در سال ۱۹۹۲ بروز کرد (Chou و همکاران، ۱۹۹۵؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۸). در سال ۱۹۹۳ بیماری لکه سفید سبب تلفات زیادی در میگوهای پنائیده در ژاپن و کره شد و حدس زده می‌شود که این سویه از ویروس از همان منشاء جدایه‌های تایوانی، تایلندی و چینی باشد (Inouye و همکاران، ۱۹۹۴؛ Moon و همکاران، ۲۰۰۳). ویروس لکه سفید در میگوهای ببری سیاه پرورشی در سال ۱۹۹۴ در مالزی شناسایی شد (Wang و

1. Chaetognata predatory worms
2 .Polychaete worms
3 .Polymerase Chain Reaction (PCR)

همکاران، ۱۹۹۹). ویروس در سال ۱۹۹۵ در تگزاس آمریکا نیز گزارش شد (Rosenberry، ۱۹۹۶). از سال ۱۹۹۹ ویروس همچنین سبب تلفات در میگوهای سفید غربی پرورشی در اکوآدور (Rodriguez و همکاران، ۲۰۰۳) و مکزیک (Galaviz-Silva و همکاران ۲۰۰۴) شد که باعث خسارات جدی به صنعت پرورش میگو هم در مرکز و هم در جنوب قاره آمریکا شد (Global Aquaculture Alliance ، a و b ۱۹۹۹). واردات میگوهای منجمد از آسیا احتمالاً منشاء انتشار ویروس لکه سفید به قاره آمریکا بود (Lightner و همکاران، ۱۹۹۷).

گمان می‌رود که ویروس لکه سفید به مزارع پرورش میگو در استرالیا و اسپانیا در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۱ به واسطه معرفی میگوهای آلوده فریز شده که به عنوان غذای تازه برای مولدین استفاده می‌شدند رسیده باشد (OIE ، ۲۰۰۳). ویروس همچنین سبب بیماری میگوها در فرانسه و ایران در سال ۲۰۰۲ شد (Rosenberry، ۲۰۰۲).این ویروس در جمعیت‌های خرچنگ آبی آتلانتیک[1] نیز گزارش شده است (Chang و همکاران، ۲۰۰۱).

بیماری لکه سفید به عنوان یک بیماری قابل گزارش توسط OIE معرفی شده و آزمایشات تشخیصی برای شناسایی ویروس در دسترس می‌باشد (OIE ، ۲۰۰۳). LO و همکاران (۱۹۹۶a) اولین بار آزمایش تشخیص ویروس لکه سفید را بر پایه تکثیر توالی خاصی از نوکلئوتید ویروس (پی‌سی‌آر) انجام دادند.

ویروس لکه سفید با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی از قبیل حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، خشک کردن در

1. Atlantic blue crab

کاغذ صافی در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت،پ.هاش خیلی اسیدی (pH=1) به مدت۱ تا ۱۰ دقیقه، پ.هاش ۳ (pH=3 ) به مدت ۱ ساعت، پ.هاش خیلی قلیایی (pH=12) به مدت ۱۰ دقیقه، اشعه ماوراءبنفش $۹\times۱۰^{۵}\mu W\ s/cm^{2}$ برای مدت ۱ ساعت، غلظت‌های متفاوتی از ضدعفونی‌کننده‌ها مثل ازن ( ۰/۸μg/ml – ۰/۵) فرمالین (۲۰۰ppm) کلرید سدیم (۲۵٪ به مدت ۲۴ ساعت) و کلروفرم به مدت ۱۵ دقیقه غیر فعال می‌شود (Balasubramanian و همکاران، ۲۰۰۶؛ Chang و همکاران، ۱۹۹۸؛ Nakano و همکاران، ۱۹۹۸). غلظت‌های مؤثر هیپوکلریت سدیم، پوویدون آیوداین و بنزالکونیوم کلراید بین ۷۵ تا ۲۰۰ قسمت در میلیون (ppm) نیز بر روی ویروس مؤثر است (Balasubramanianو همکاران، ۲۰۰۶؛ Changو همکاران، ۱۹۹۸ ).

**د-۱-۴- انتقال ویروس**

ویروس لکه سفید می‌تواند به صورت افقی و عمودی بین میگوها منتقل شود (Lotz و Soto، ۲۰۰۲؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۱) و در دیگر گونه‌های سخت پوستان وحشی و پرورشی و موجودات آبزی از قبیل خرچنگ دراز آب شیرین، خرچنگ‌های پهن، کوپه‌پودها و ... بسته به میزبان، سطوح متفاوتی از تلفات را ایجاد می‌کند (Jesus و همکارن،۲۰۰۷). عفونت میگو با ویروس لکه سفید به دلایل متعددی بروز می‌کند که عبارتند از انتقال سریع ویروس در سیستم‌های پرورش، میگوهای آلوده، آب و هم‌جنس‌خواری میگوهای بی‌حال (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wuو همکاران، ۲۰۰۱). اما مولدین آلوده و پست لاروهای آلوده نیز منبع عمده عفونت برای میگوهای یک مزرعه به حساب می‌آیند. منابع بالقوه برای انتقال ویروس فعالیت‌های انسانی، مهاجرت پرندگان دریایی و دیگر حیوانات، محصولات غذایی منجمد آلوده، رسوبات

آلوده استخرها، وسایل و ابزار آلوده‌ی آبزی‌پروری و میگوهای آلوده‌ی درمان نشده می‌باشند (Lightner و همکاران، ۱۹۹۷).

## د-۱-۵- بیماری‌زایی[1] و واگیری[2]

بیماری‌زایی، توانایی عامل بیماری‌زا در ایجاد بیماری و واگیری، درجه‌ای از بیماری‌زایی در بین گروه‌ها یا گونه‌ها است (Shapiro-Ilan و همکاران، ۲۰۰۵). واگیری (حدت) یک عامل بیماری‌زا را می‌توان به واسطه زمان بروز بیماری (علائم بالینی)، بروز تلفات، مدت زمان رسیدن به تلفات ۱۰۰درصدی، مدت زمان کشندگی متوسط[3] و شدت عفونت در بافت‌ها اندازه گیری نمود.تحت شرایط آزمایشی، تلقیح داخل عضلانی یا خوراکی ویروس، غوطه وری در سوسپانسیون ویروسی، تغذیه با بافت آلوده یا زندگی در کنار موجودات بیمار در میگو از مرحله پست لاروی به بعد سبب بروز بیماری می‌شود (Chouو همکاران، ۱۹۹۸؛ Escobedo-Bonillaو همکاران، ۲۰۰۶؛ Kanchanaphum و همکاران، ۱۹۹۸؛ Leonardo و همکاران، ۲۰۰۵؛ Prior و همکاران، ۲۰۰۳؛ Yoganandhanو همکاران، ۲۰۰۳a).

بر اساس یافته‌های Yoganandhan و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیماری لکه سفید در مراحل اولیه لاروی ( ناپلی، زوآ و مایسیس) میگوی ببری سیاه به واسطه مواجهه از طریق غوطه وری و خوراکی بروز نمی‌کند.گزارشات مختلفی از محققین در خصوص سن ابتدایی میگوها در ابتلا به بیماری لکه سفید وجود دارد (Yoganandhanو همکاران، ۲۰۰۳a). Venegas و همکاران (۱۹۹۹) این سن را، پست لارو مرحله۶ ( PL6)، Flegel (۲۰۰۷) سن اولیه ابتلا به بیماری را

1. Pathogenisity
2 .Virulence
3 .LT50

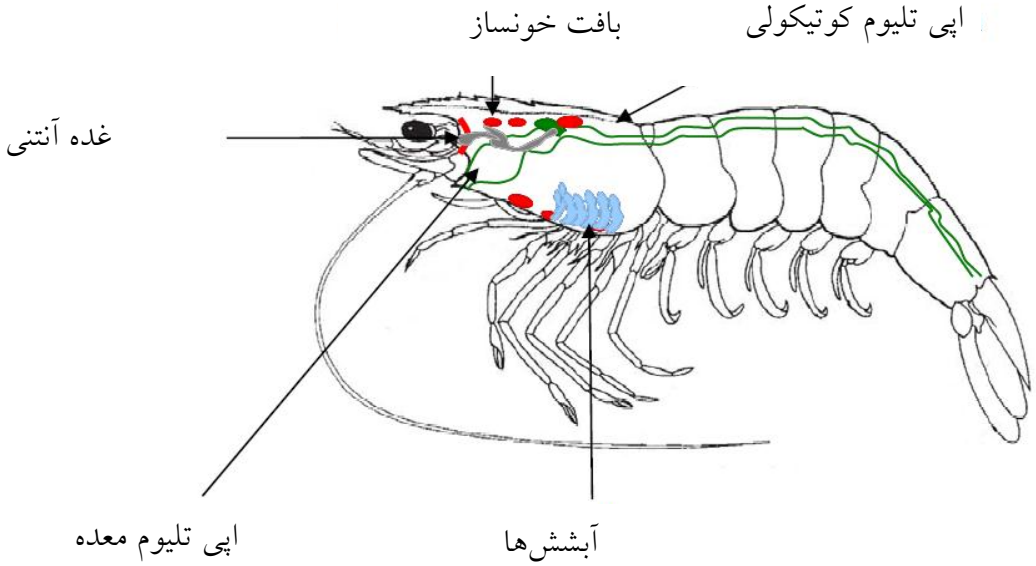
پست لارو مرحله۱۰ (PL10) و Pérez و همکاران (۲۰۰۵) این سن را پست لارو مرحله۳۰ (PL30) ذکر کرده‌اند. یافته‌های متفاوت در این مطالعات می‌تواند ناشی از گونه‌های متفاوت میگوی مورد آزمایش، روش‌های متفاوت تلقیح ویروس، تیتر و میزان ویروس عفونی استفاده شده، جدایه‌های متفاوت ویروس و یا محدودیت‌های تشخیصی باشد. Momoyama و همکاران (۱۹۹۹) و Wang, Q. و همکاران (۱۹۹۹) اختلاف حساسیت به ویروس لکه سفید در مراحل مختلف زندگی میزبان و گونه‌های متفاوت میزبان را مشخص نمودند.

تکثیر ویروس لکه سفید درون هسته سلول‌ها رخ می‌دهد (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Wang, Y. و همکاران، ۱۹۹۹؛Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). Li و همکاران (۲۰۰۷) اعلام کردند که مولکول اینتگرین[1] در سطح سلول‌های میزبان در عفونت لکه سفید دخیل بوده و به عنوان یک گیرنده سلولی عمل می‌کند. آثار ویروس لکه سفید در همولنف، آبشش‌ها، بافت پوششی معده و بافت پوششی کوتیکولی بدن، بافت‌های خونساز، اندام لنفوئیدی، غدد آنتنی، بافت همبند، بافت عضلانی، هپاتوپانکراس، قلب، روده میانی، روده خلفی، بافت عصبی، چشم‌های مرکب، پایه چشم‌ها، پاهای شنا، پاهای راه‌روی، بیضه‌ها و تخمدان میگوهایی که به صورت طبیعی و تجربی آلوده شده بودند مشاهده شده است (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۷؛ Rajan و همکاران، ۲۰۰۰؛ SahulHameed وهمکاران،۱۹۹۸؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵؛ Yoganandhan و همکاران، ۲۰۰۳b).

با بررسی‌های کمی بیماری‌زایی، حدس زده می‌شود که بافت اصلی و هدف برای تکثیر ویروس آبشش‌ها، اپی تلیوم معده و اپی‌تلیوم کوتیکولی بدن، بافت‌های خونساز، اندام لنفوئیدی و

1. Integrin

غدد آنتنی است (Durand وLightner ، ۲۰۰۲؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷؛ Tan و همکاران، ۲۰۰۱). بافت‌های هدف اصلی برای تکثیر ویروس لکه سفید در شکل ۲-۵ آمده است.




**شکل ۲-۵- بافت‌های هدف اصلی تکثیر ویروس لکه سفید در بدن میگو**

در اندام‌های هپاتوپانکراس و قلب فقط بافت همبند آلوده می‌شود (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین سلول‌های آلوده به ویروس را نمی‌توان در سکوم روده میانی پیدا کرد (Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷؛ Sahul Hameed وهمکاران،۱۹۹۸).در مرحله انتهایی بیماری سلول‌های اپی‌تلیال، بافت خونساز و توبول‌های غدد آنتنی دژنره شده و لیز می‌شوند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۷). Escobedo-Bonilla و همکاران (۲۰۰۷) راه ورود ویروس لکه سفید به بدن و مکانیسم انتشار آن در میان بافت‌ها را مشخص نمودند. بر این اساس آبشش‌ها و اپی‌تلیوم روده قدامی در میگوی سفید غربی درگاه ورود ویروس لکه سفید

پس از تلقیح خوراکی آن محسوب می‌شوند. پس از تکثیر اولیه در این بافت‌ها، ویروس از غشاء پایه عبور کرده و به سینوس‌های خونی مربوطه می‌رسد. از طریق جریان همولنف ویروس در اندام‌های داخلی منتشر می‌شود که موج جدیدی از عفونت را ایجاد می‌کند. شیوع طبیعی بیماری لکه سفید به اشکال فوق حاد، حاد تا تحت حاد ومزمن تقسیم بندی می‌شود که به ترتیب تلفات آن‌ها بین ۳-۲ روز، ۱۰-۷ روز و ۲۸-۱۵ روز بروز می‌کند ( Sudha و همکاران، ۱۹۹۸).

تفاوت حدت در بین جدایه‌های ویروس لکه سفید بر اساس مدت زمان ایجاد تلفات ۵۰ درصدی[1] و ۱۰۰ درصدی[2] بررسی شده است (Lan و همکاران، ۲۰۰۲؛ Marksو همکاران، ۲۰۰۵؛ Wang, Q.و همکاران، ۱۹۹۹).

در این مطالعات میزان نامشخصی از ویروس برای تلقیح استفاده شد. روش‌های متفاوت تلقیح (خوراندن بافت آلوده یا تزریق داخل عضلانی) و گونه‌های متفاوتی از میگو ( ببری سیاه، سفید غربی و خرچنگ دراز آب شیرین) در آزمایشات استفاده شدند و علاوه براین، آزمایشات تکرار نداشت.

Lan و همکاران (۲۰۰۲) دریافتند که در خرچنگ دراز آب شیرین ویروس لکه سفید با ژنومی با اندازه ۳۰۵ کیلوجفت باز زودتر از ویروسی با ۴/۸ کیلوجفت باز حذف تلفات ۱۰۰ درصدی می‌دهد. Marks و همکاران (۲۰۰۵) نیز دریافتند که تلفات میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید حاوی کوچکترین ژنوم (۲۹۳ کیلوجفت باز) ۸ روز پس از تلقیح به ۱۰۰ درصد رسید ($LT_{50}$=3.5 dpi) درحالی‌که با ویروسی حاوی بزرگترین ژنوم (۳۱۲ کیلوجفت باز) ۱۷ روز پس از تلقیح ($LT_{50}$=14 dpi) بود.

1. LT50
2 .LT100

در آزمایشگاه چالش، ویروس لکه سفید یک عامل بیماری‌زای منحصر بفرد است که ممکن است سبب بیماری و تلفات در میگوی سفید غربی عاری از عامل بیماری‌زا[1] و دیگر میگوها و گونه‌های خرچنگ دراز آب شیرین شود. در یک مورد عفونت طبیعی، چندین عامل زیستی و غیر زیستی ممکن است بر وقوع یک همه گیری لکه سفید مؤثر باشد. عفونت همزمان با چندین ویروس مختلف مثل پاروویروس هپاتوپانکراس،مونودون باکلوویروس و ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز به همراه لکه سفید گزارش شده است (Flegelو همکاران، ۲۰۰۴؛ Manivannan و همکاران، ۲۰۰۲؛ Umesha و همکاران، ۲۰۰۶).

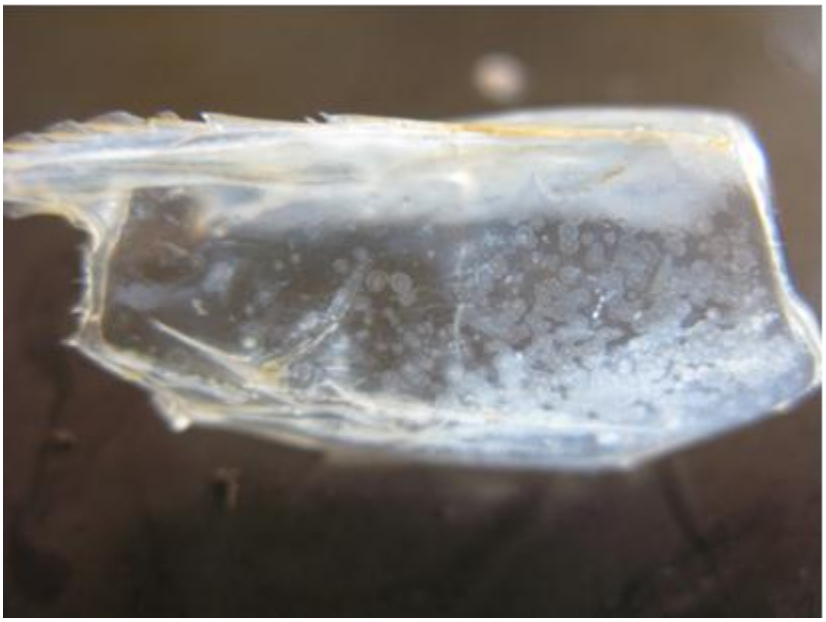
**د-۲- علایم بالینی**

بدن میگوهای بیمار قرمز رنگ شده و غذا نمی‌خورند، نسبت به محرک‌ها بی‌تفاوت هستند، کوتیکول میگوها نرم شده از اپی‌درم زیرین جدا می‌شود، زوائد برانشیواستگال به دلیل تجمع مایع متورم می‌شوند، هپاتوپانکراس متورم و زرد کم‌رنگ می‌شود، همولنف رقیق شده و تأخیر در لخته شدن بروز می‌کند (Durand و همکاران، ۱۹۹۷؛ Lightnerو همکاران، ۱۹۹۸؛ Lightner، ۱۹۹۶؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶ b؛ Otta و همکاران، ۱۹۹۹؛ Sahul-Hameed و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wang C.H. و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang, Y. و همکاران، ۱۹۹۹). در مزرعه عوامل ایجاد کننده استرس مثل محیط، شرایط استخر (شوری، دما و نورخورشید) و غذا سبب افزایش پیشرفت بیماری لکه سفید در میگوهای جوان در هر سن و اندازه‌ای می‌شود اما تلفات شدید معمولاً ۱ تا ۲ ماه پس از ذخیره سازی پست لاروها در استخر بروز می‌کند. میگوهای بیمار اغلب

1 .SPF

کناره استخر تجمع کرده و علایم بالینی را ۱ تا ۲ روز قبل از اولین تلفات نشان می‌دهند (Kasornchandra و همکاران، ۱۹۹۸؛ Kou و همکاران، ۱۹۹۸).

فقط با علایم بالینی نمی‌توان بیماری را تشخیص داد زیرا مثلاً بی‌اشتهایی در میگوهای غیرآلوده قبل و بعد از پوست اندازی مشاهده می‌شود. لکه‌های سفید روی کاراپاس در عفونت‌های باکتریایی نیزمشاهده می‌شوند و دیگر علایم بالینی غیراختصاصی بوده و برای دیگر بیماری‌ها نیز معمول است (Flegel، ۲۰۰۶؛ Jory و همکاران،۲۰۰۱؛ Wang, Y. و همکاران، ۲۰۰۰).



**شکل ۲-۶- لکه های سفید بر روی کاراپاس یک میگوی آلوده به ویروس لکه سفید**



**شکل ۲-۷- قرمزی و تغییر رنگ هپاتوپانکراس در میگوی سفید غربی بیمار**



**شکل ۲-۸- تلفات در کناره استخرهای پرورشی**

**د-۳- هیستوپاتولوژی**

مطالعات هیستوپاتولوژی بر روی میگوهای آلوده به لکه سفید نشان داد که اهداف اولیه تکثیر ویروس عمدتاً بافت‌های با منشاء اکتودرم و مزودرم می‌باشند ( Lo و همکاران، ۱۹۹۷؛ Momoyama و همکاران، ۱۹۹۴؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۵ و Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). در اوایل عفونت معده، آبشش‌ها، اپی‌درم و بافت همبند هپاتوپانکراس به ویروس آلوده می‌شوند. در مراحل بعدی بیماری اندام لنفوئیدی، غدد آنتنی، بافت عضلانی، بافت خونساز، قلب، روده خلفی و قسمتی از روده میانی به ویروس آلوده می‌شوند. بافت عصبی و چشم‌های‌مرکب خیلی دیر به ویروس آلوده می‌شوند. معده، آبشش‌ها، اپی‌درم کوتیکول، اندام لنفاوی، بافت خونساز و غدد آنتنی بسیار شدید به ویروس آلوده شده و در مراحل نهایی نکروز می‌شوند (Chang و همکاران، ۱۹۹۶ و Lo و همکاران، ۱۹۹۷). سلول‌های هپاتوسیت هپاتوپانکراس و سلول‌های اپی‌تلیال روده میانی هرگز آلودگی به ویروس را نشان نمی دهند. کاهش قابل توجه در تعداد هموسیت‌ها پس از آلودگی به ویروس لکه سفید مشاهده می‌شود (Hennig و همکاران، ۱۹۹۸؛ Jiravanichpaisal و همکاران، ۲۰۰۱؛ van de Braak و همکاران،۲۰۰۲). این مورد شاید به دلیل عفونی شدن خود هموسیت‌ها و آپوپتوزیس در بافت‌های خونساز رخ بدهد (Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۳). هموسیت‌های آلوده به ویروس لکه سفید یا در حالت آپوپتوزیس یا حذف از گردش خون به واسطه چسبیدن به بافت میزبان قرار می‌گیرند و درنتیجه‌ی کاهش غیرطبیعی هموسیت‌ها سیستم دفاعی میگو نیز ضعیف خواهد شد.

### د-۳-۱- آسیب شناسی سلولی ویروس لکه سفید

تکثیر و مونتاژ ویریون‌ها در هسته سلول میزبان رخ می‌دهد و علائم اولیه عفونت با ظهور هسته متورم هموژن و مهاجرت کروماتین‌ها به کناره هسته بروز می‌کند (Lightner و همکاران، ۱۹۹۸؛ Wang و همکاران، ۱۹۹۹ و Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۵). مورفوژنز ویروس با تشکیل غشاء ویروسی در نوکلئوپلاسم آغاز می‌شود. تشکیل نوکلئوکپسیدها با توبول‌های طولانی و خالی گسترده‌ای شروع می‌شود که به قطعات ۱۲ تا ۱۴ حلقه‌ای می‌شکنند تا پوسته نوکلئوکپسیدهای خالی را شکل بدهند. سپس کپسیدهای خالی با غشاء محصور می‌شوند که در یک انتها باز می‌ماند. نوکلئوپروتئین‌ها احتمالاً همراه با دنا ویروسی از همین انتهای باز مانده وارد کپسیدهای خالی می‌شوند. ویریون‌های بالغ پس از تنگ شدن سوراخ و تشکیل زائده دم مانند از اتساع غشاء بوجود می‌آیند (Durand و همکاران، ۱۹۹۷ و Wang و همکاران، ۱۹۹۹ و a ۲۰۰۰). مشخص نشده است که ویریون‌ها چگونه از هسته‌های آلوده آزاد می‌شوند ولی بیشترین احتمال جوانه زدن یا پاره کردن غشاءهسته یا غشاء سلول میزبان است.

### د-۴- تشخیص بیماری لکه سفید

چندین روش شامل مشاهده با میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ فاز کنتراست، میکروسکوپ زمینه تیره، سنجش بیولوژیک[1]، میکروسکوپ الکترونی، روش های سرم شناسی، روش های مولکولی و هیستوپاتولوژیک برای تشخیص عفونت لکه سفید توسعه یافته اند (Lightner و Redman ، ۱۹۹۸). انتخاب روش تشخیص بیماری به هدف بررسی، بستگی دارد. به

1 .Bioassay

عنوان مثال برای آزمایش مولدین و ناپلی‌ها در هچری‌ها روش‌های تشخیص متفاوتی در مقایسه با تحقیق بر روی بیماری‌زایی لکه سفید مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های هیستوپاتولوژی، سرم شناسی و مولکولی بیشتر مورد استفاه قرار می‌گیرند.

**د-۴-۱- روش هیستوپاتولوژی**

در مراحل اولیه عفونت لکه سفید در میگوی سفید غربی گنجیدگی از نوع Cowdry A وجود دارد که به وسیله کروماتین به حاشیه رانده شده و جدا شده از نوکلئوپلاسم مشخص می‌شود. در مراحل پیشرفته بیماری گنجیدگی‌های بازوفیلی و در نهایت پیکنوز و شکستگی هسته مشاهده می‌شود (Lightner، ۱۹۹۶). این روش از حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به روش مولکولی و سرم شناسی برخوردار بوده و نیاز به افراد متخصص و با تجربه دارد.

**د-۴-۲- روش‌های سرم شناسی**

این روش‌ها بر پایه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی کلونال تولید شده در برابر آنتی‌ژن ویروس یا آنتی‌ژن‌های نوترکیب ویروس می‌باشد. به منظور توسعه چندین روش از قبیل ایمونوفلورسانس، ایمونوهیستوشیمی، ایمونوبلاتینگ، نوارهای آزمایش ایمونوکروماتوگرافی، الیزا و وسترن بلات از آنتی‌بادی‌های مونو و پلی کلونال تولید شده بر علیه پروتئین‌های ویروسی VP28 و VP28 نوترکیب استفاده می‌شود (Anil و همکاران، ۲۰۰۲؛ Escobedo-Bonilla و همکاران، ۲۰۰۵ و ۲۰۰۷؛ .Liu, W و همکاران، ۲۰۰۲؛ Makesh و همکاران، ۲۰۰۶؛ Nadala و همکاران، ۱۹۹۷؛ Poulos و همکاران، ۲۰۰۱؛ Sithigorngul و همکاران، ۲۰۰۶؛ Yoganandhan و همکاران، ۲۰۰۴؛ You و همکاران، ۲۰۰۲).

این روش‌ها برای تأیید تشخیص عفونت و مشاهده سلول‌های آلوده و یا اندازه‌گیری کمی آنتی‌ژن‌های ویروسی می‌باشد. روش‌های سرم شناسی به بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی و اختصاصیت آنتی بادی تولید شده در برابر آنتی‌ژن‌های ویروسی بستگی دارد. پراکسیداز داخلی میگو ممکن است سبب ایجاد نتایج مثبت کاذب در آزمایشات ایمونوپراکسیداز شود ( Zhan و همکاران، ۲۰۰۳).

**د-۴-۳- روش‌های مولکولی**

این روش ها شامل چندین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، In situ hybridization و dot blot hybridization می‌باشد.

**د-۴-۳-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز**

این روش بر پایه طراحی پرایمرها برای قسمت خاصی از توالی ژنوم ویروس لکه سفید می‌باشد. روش های مختلف پی سی‌آر شامل پی‌سی‌آر تک مرحله‌ای[1]، پی‌سی‌آر سمی نستد[2] ، پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای[3]، پی‌سی‌آر رقابتی کمی[4] و پی‌سی‌آر ریل تایم[5] می‌باشد ( Durand و Lightner، ۲۰۰۲؛ Hossain و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hsu و همکاران، ۱۹۹۹؛ Kiatpathomchai و همکاران، ۲۰۰۱؛ Lightner، ۱۹۹۶؛ Lo و همکاران، ۱۹۹۶a؛ Tang و Lightner ، ۲۰۰۰؛Tapay و همکاران، ۱۹۹۹).

پی‌سی‌آر تک مرحله‌ای، ویروس لکه سفید را در میگوهایی که دارای تراکم قابل توجهی از دنا ویروس هستند تشخیص می‌دهد که معمولاً در این حالت میگوها علایم بیماری را نشان

1. One step PCR
2 .Semi nested PCR
3 .Two step PCR
4 .Quantitative competitive PCR
5. Real time PCR

نمی‌دهند ( Jian و همکاران، ۲۰۰۵؛ Otta و همکاران، ۱۹۹۹). پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای می‌تواند عفونت‌های خفیف را در مولدین، ناپلی، پست لارو و میگوهای جوان تشخیص دهد و پی‌سی‌آر کمی می‌تواند برای اندازه‌گیری میزان بار ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. معایب روش پی‌سی‌آر شامل تشخیص اشتباه (مثبت کاذب)، عدم توانایی این روش در اثبات عفونی بودن دنا شناسایی شده، وابستگی حساسیت آزمایش به پرایمر طراحی شده، نقص در جایابی ویروس در بافت‌ها و امکان حضور ممانعت کننده‌ها در برخی بافت ها (منفی کاذب) می‌باشد (Claydon و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hossain و همکاران، ۲۰۰۴؛ Shekhar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Sritunyalucksana و همکاران، ۲۰۰۶). پروتکل‌های پی‌سی‌آر مرکب[1] به منظور تشخیص همزمان ویروس لکه سفید و دیگر ویروس‌ها مثل ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز، ویروس سندرم تورا و مونودون باکلوویروس و یا دو ویروس ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز و ویروس سندرم تورا توسعه یافته است (Natividad و همکاران، ۲۰۰۶؛ Quéré و همکاران، ۲۰۰۲؛ Tsai و همکاران، ۲۰۰۲؛ Xie و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۶). یک پروتکل جدید به نام پی‌سی‌آر In situ قادر به تشخیص عفونت‌های خفیف در بافت ها در مراحل اولیه بیماری است (Jian و همکاران، ۲۰۰۵). Kono وهمکاران در سال ۲۰۰۴مدعی شدند که روش دیگری به نام لمپ[2] حساس‌تر از دیگر روش‌های پی‌سی‌آر می‌باشد و می‌تواند حداقل یک فمتوگرم ویروس را شناسایی کند.

### د-۴-۳-۲- روش *In situ hybridization*

1 .Multiplex PCR
2. LAMP(Loop mediated isothermal amplification)

این روش دنای ویروس را در بافت میزبان به وسیله هیبریدیزاسیون با پروب دنا تشخیص می‌دهد. این روش برای تشخیص سلول‌های آلوده در بافت مفید است اما نسبت به پی‌سی‌آر از حساسیت کمتری برخوردار است و نیاز به تجهیزات هیستوپاتولوژی دارد ( Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Wongteerasupaya و همکاران، ۱۹۹۶).

### د-۴-۳-۳- روش *Dot blot hybridization*

در این روش قطعه ای از دنای ویروس را به وسیله هیبریدیزاسیون با پروب دنا تشخیص می‌دهد. این روش هم در مقایسه با پی‌سی‌آر از حساسیت کمتری برخوردار است ( Dupuy و همکاران، ۲۰۰۴؛ Shekhar و همکاران، ۲۰۰۶).

عفونت‌های ویروس لکه سفید در بافت هدف به وسیله پی‌سی‌آر یک مرحله‌ای ۱۲ ساعت پس از تلقیح ویروس، با روش هیستوپاتولوژی ۳۶ ساعت، با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و ایمونوهیستوشیمی ۱۲ ساعت، با روش In situ hybridization ۱۶ ساعت و ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس با روش وسترن بلات تشخیص داده می‌شود ( Chang و همکاران، ۱۹۹۶؛ Escobedo Bonilla و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yoganandhan و همکاران، ۲۰۰۳b و ۲۰۰۴).

### د-۵- ایمنی ضد ویروسی

در سخت پوستان فقط ایمنی ذاتی بدون حافظه سرم شناسی وجود دارد ( Lee و Söderhäll،۲۰۰۲). ایمنی ذاتی شامل سدهای فیزیکی، پاسخ سلولی و خونی است. کوتیکول سفت و مومی شکل در سخت پوستان به عنوان یک سد مکانیکی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Brey و همکاران، ۱۹۹۳؛ Lee و Söderhäll،۲۰۰۲). فاکتورهای خونی به طور عمده از

هموسیت‌ها منشاء می‌گیرند و در طی پاسخ ایمنی آزاد می‌شوند. موادی که در طی پاسخ ایمنی خونی[1] آزاد می‌شوند شامل: لکتین‌ها، آنزیم‌های دفاعی ( فنل اکسیداز)، لیپوپروتئین‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی، پروتئین متصل شونده به بتا ۱و۳ گلوکان، پروتئین متصل شونده به لیپوپلی ساکارید، پروتئین متصل شونده به پپتیدوگلیکان و میانجی‌های اکسیژن فعال هستند. هموسیت‌ها در ایجاد لخته، شناسایی ذرات خارجی، فاگوسیتوز، ملانیزه کردن، کپسوله کردن، کشندگی سلولی و ارتباطات سلول به سلول نقش دارند ( Lee و Söderhäll،۲۰۰۲ ؛Newman و Bullis، ۲۰۰۱). بیشترین پاسخ های سلولی و خونی مطالعه شده دربرابر عفونت های باکتریایی، قارچی وانگلی هستند. مطالعات اخیر شواهدی از ایمنی ضد ویروسی در میگوها را مشخص کرده است که مشتمل بر وجود گیرنده های شبه تول[2]، تداخل رنا[3]، مواد ضدویروسی در بافت ها و ژن‌های ایمنی می‌باشد. گیرنده های شبه تول در پستانداران به عنوان فعال کننده سلول‌های ایمنی فعالیت می‌کند، همچنین سیگنال رسانی داخل سلولی بر علیه عفونت، شناسایی لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان و لیپوپروتئین ها را داشته و در ایمنی ضد ویروسی نیز دخیل می باشد (Barton ، ۲۰۰۷؛Schröder و Bowie، ۲۰۰۵). گیرنده های شبه تول در میگوی سفید غربی و میگوی ببری سیاه شناسایی شده است ( Arts وهمکاران، ۲۰۰۷؛Yang و همکاران، ۲۰۰۷).نقش گیرنده های شبه تول در میگوها در برابر عفونت ویروسی همچنان در حال بررسی است. ژن‌های کد شونده برای تداخل رنا در میگوی سفید غربی یافت شده است ( Robalino و همکاران، ۲۰۰۷). تزریق رنای

1. Humoral
2 .Toll Like Receptor
3 .RNA Interference

دورشته‌ای[1] در میگوی سفید غربی ایمنی ضد ویروسی را القاء می‌کند ( Robalino و همکاران، ۲۰۰۴).

همچنین در میگوی چینی رنای کوتاه تداخل کننده[2] مرتبط با پروتئین های ویروسیVP15 یا VP28 در کاهش تلفات در میگوی ببری سیاه و میگوی ژاپنی مؤثر بوده است ( Kim و همکاران، ۲۰۰۷؛ Westenberg و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۷).

Xu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که به وسیله چندین تزریق از رنای کوتاه تداخل کننده پروتئین ویروسی VP28 از رونویسی و تکثیر ویروس لکه سفید جلوگیری می شود. ژن ضد ویروس PmAV از میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید کلون شد. PmAV از روز دوم پس از آلودگی با میزان بالای ویروس در هپاتوپانکراس بیان می‌شود. این ژن در شرایط In vitro در برابر اثر سیتوپاتیک[3] ایریدوویروس هامور سنگاپوری[4] مؤثر بود ( Luo و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷).

یک ژن دیگر به نام فاکتور ضد پلی ساکارید[5] در خرچنگ دراز آب شیرین گونه *Pacifastacus leniusculus* پس از تزریق با ویروس غیر فعال شده با اشعه ماوراء بنفش مشاهده شد. این فاکتور سبب تکثیر کمتر ویروس و افزایش تلفات آهسته تر در مقایسه با آن‌هایی که فقط ویروس دریافت کرده بودند شد ( Liu, H. و همکاران، ۲۰۰۶).

1. dsRNA
2 .SiRNA
3 .CPE
4 .SGIV
5 .Antipolysaccharide factor

۲۲ ژن ضد ویروس که پروتئین‌هایی مثل پروتئین شبه اینترفرون[۱] و پروتئین شبه اولیگوسنتتاز[۲] را کد می‌کنند در هموسیت میگوهای ژاپنی بازمانده از شیوع بیماری لکه سفید یافت شده است ( He و همکاران، ۲۰۰۵). دو پروتئین از هموسیانین میگوی ببری سیاه آلوده به ویروس لکه سفید جداشد. این پروتئین ها در شرایط آزمایشگاهی[۳] از تکثیر ویروس‌های ایریدوویروس هامور سنگاپور، ویروس قورباغه تیپ۳[۴]، ویروس لنفوسیستیس[۵]، رئوویروس تردفین[۶]، بیرناویروس ماهی آنجل[۷] و ویروس نکروز عفونی پانکراس[۸] جلوگیری کردند ( Zhang و همکاران، ۲۰۰۴). مواد ضد ویروس در بافت‌های استخراج شده ازمیگوی سفید شمالی[۹]، خرچنگ آبی آتلانتیک[۱۰] و خرچنگ قرمز مرداب[۱۱] یافت شده است. این مواد در برابر ویروس واکسین[۱۲]، ویروس فلج اطفال[۱۳]، ویروس منگو[۱۴]، ویروس سیندبیس[۱۵] ، ویروس بانزی[۱۶] و ویروس تورم دهان وزیکولی[۱۷] در شرایط آزمایشگاهی مؤثر بوده اند ( Pan و همکاران، ۲۰۰۰).

Gross و همکاران در سال ۲۰۰۱ ژن‌های ایمنی را در هموسیت‌ها و هپاتوپانکراس میگوی سفید غربی و میگوی سفید شمالی مبتلا به بیماری لکه سفید گزارش کردند.

1. Interferon like protein
2 .Oligo synthetase like protein
3 .In vitro
4 .F.V3
5 .LDV
6 .ThRV
7 .ABV
8 .IPN
9 .*P. stiferus*
10 .*Callinectes sapiduss*
11 .*Procambarus clarkii*
12 .Vaccina virus
13 .*poliovirus*
14.*mengovirus*
15 .*Sindbis* virus
16.Banzi virus
17.vesicular stomatitis virus

پروتئین‌های شوک حرارتی ۹۰ و ۷۰[1]، ترهالوز-فسفات سینتتاز[2] و یوبیکوئیتین سی[3] در میگوی چینی مبتلا به لکه سفید افزایش می‌یابد ( Wang و همکاران، ۲۰۰۶). سطوحی از دیگر فاکتورهای ایمنی از قبیل فنل اکسیداز، لیزوزیم، همولیزین و هماگلوتینین در میگوهای بازمانده از وقوع بیماری بالاتر بوده است ( He و همکاران، ۲۰۰۵).

Venegas و همکاران (۲۰۰۰) یک پاسخ شبه ایمنی[4] و همچنین حضور یک مولکول خنثی کننده ویروس لکه سفید را در پلاسمای میگوی ژاپنی زنده مانده از بروز طبیعی بیماری لکه سفید گزارش کردند.

لاروهایی که از مولدین ببری سیاه تزریق شده با بتا ۱و۳ و ۱و۶ گلوکان تولید شده بودند بازماندگی بهتری را در برابر چالش با ویروس لکه سفید در مقایسه با گروه شاهد که فقط سالین دریافت کرده بودند نشان دادند. پس از این آزمایش محققین فرضیه انتقال ایمنی از مولدین به پست‌لاروها را مطرح نمودند (Huang و Song، ۱۹۹۹). Roux و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که در میگوهای سفید شمالی آلوده به ویروس لکه سفید ژن های مرتبط با پروتئین های متصل شونده به لیپوپلی‌ساکارید و بتا ۱و۳ گلوکان افزایش[5] می‌یابند. این تحقیق پاسخ عمومی دفاعی سخت پوستان در برابر انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا (ویروس، باکتری و قارچ) را نمایان ساخت.

بروز بیماری در میگوها به دلیل ویروس‌هایی مثل لکه سفید، سرزرد، سندروم تورا و نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز با تلفات شدید ابتدایی شروع شده به دنبال آن عفونت

1.Heat shock protein:HSP90, HSP70
2 .TPS
3 .Ubiquitin C
4 .Quasi immune response
5 .Upregulated

مزمن در بازمانده‌ها بروز می‌کند. پدیده باقی‌ماندن عفونت را تطابق ویروسی[1] می‌نامند. سازوکار عفونت پایدار در میگو ناشناخته است. ذرات ناقص ویروسی یا اثر بر آپوپتوز ویروسی را می‌توان در این سازوکار دخیل دانست (Flegel، ۲۰۰۷). سلول‌های آپوپتوتیک را در عفونت های طبیعی و تجربی با ویروس لکه سفید گزارش کرده‌اند ( Sahtout و همکاران، ۲۰۰۱؛ Sahul Hameed و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۳). در طول بررسی عفونت لکه سفید افزایش سلول‌های آپوپتوتیک مشاهده شد اما هنوز مشخص نیست که آیا آپوپتوز مرحله‌ای منتهی به مرگ می شود یا محافظت در برابر ویروس (Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۳).

**د-۶- راهکارهای کنترل و کاهش تلفات ناشی از بیماری لکه سفید**

همه گیری‌های جهانی ایجاد شده توسط ویروس لکه سفید سبب زیان‌های جدی در تولید مزارع میگو در آسیا و آمریکا گردید. در پاسخ به این خسارات محققین چندین راهکار پیشگیری کننده و درمانی را مورد آزمایش قرار دادند:

**د-۶-۱- ایمنی زیستی[2]**

واژه ایمنی زیستی به معنای تلاش در جهت جلوگیری از وقوع، تماس، انتقال و انتشار عوامل بیماری‌زا در میگوها می‌باشد (Lightner، ۲۰۰۵؛ Menasveta، ۲۰۰۲). این حالت شامل توسعه ذخایر میگوی عاری از عامل بیماری‌زا[3]، ممانعت از ورود عوامل بیماری‌زا به مولدین در هچری‌ها و مزارع، عدم تعویض آب و ضدعفونی آب قبل از پرکردن استخرهای پرورشی، رعایت

1. Viral accommodation
2 .*Biosecurity*
3 .SPF

بهداشت کارگران و استفاده از غذای با کیفیت است (Lightner، ۲۰۰۵). در حال حاضر راهکارهای ایمنی زیستی به طور گسترده‌ای در مزارع پرورش میگو مورد استفاده قرار می‌گیرد، اگرچه که در شرایط مزرعه رعایت ایمنی زیستی به صورت مطلق امکان‌پذیر نیست (Schuur، ۲۰۰۳). به عنوان مثال موفقیت در جلوگیری از وقوع بیماری در میگوهای مزارع پرورشی فقط بستگی به آزمایش پست لاروها قبل از ذخیره سازی ندارد زیرا اشتباه در حین نمونه برداری و یا پاسخ‌های اشتباه ممکن است بروز نماید (Fegan و Clifford، ۲۰۰۱). در موردی که میگوی بیمار به مزرعه‌ای معرفی می‌شود قرنطینه ممکن است برای کاهش خطر انتقال بیماری مفید باشد. حذف میگوهای تلف شده از مزرعه، رژیم غذایی با کیفیت و مدیریت بهتر غذادهی نیز می‌توانند خطر وقوع بیماری را کاهش دهند.

**د-۶-۲- مواد ضد ویروس**

ماده ضد ویروس ترکیبی است که توانایی تکثیر ویروس را در هر مرحله‌ای از رونوشت برداری (اتصال، ورود، پوشش برداری، رونویسی، ترجمه و مونتاژ) سرکوب نماید. اثر ضدویروسی پلی‌ساکاریدهای سولفاته استخراج شده از جلبک‌های دریایی در برابر ویروس‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی به خوبی شناخته شده است (Witvrouw و De Clercq، ۱۹۹۷). جلبک‌های *اسپیرولینا پلانتیس*[1] و *اسپیرولینا ماکسیما*[2] دارای فعالیت ضدویروسی هستند (Hayashi و Hayashi، ۱۹۹۶؛Hernández-Corona و همکاران، ۲۰۰۲).فوکان‌های سولفاته (فوکوئیدان)[3] می‌تواند از ۴۳ گونه جلبک قهوه‌ای استخراج شود. فوکوئیدان‌های جلبک قهوه‌ای از لحاظ

*1.Spirulina platensis*
*2 .S. maxima*
3 .Sulfated fucans (fucoidan)

ساختاری بسیار پیچیده و هتروژن هستند (Berteau و Mulloy، ۲۰۰۳). در یک پژوهش فوکوئیدان استخراج شده از جلبک دریایی *سارگاسوم پلی‌سیستوم*[1] در جیره غذایی استفاده شد. این غذا به میگوهای جوان ببری سیاه به مدت ۴ روز قبل و بعد از چالش با ویروس لکه سفید خورانده شد. میگوهایی که بیشترین میزان فوکوئیدان در جیره غذایی (۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن میگو) را دریافت کرده بودند درصد بازماندگی بالایی را نشان دادند (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). عصاره دانه گیاه راش هندی[2] دارای اثر ضدویروسی در برابر ویروس هرپس سیمپلکس[3] است (Elanchezhiyan و همکاران، ۱۹۹۳). عصاره اتانولی بیس (۲–متیل هپتیل)فتالات[4] برگ‌های گیاه راش هندی نیز در یک جیره غذایی استفاده شد و اثرات ضدویروسی آن در میگوی ببری سیاه در برابر ویروس لکه سفید ارزیابی شد. میگوها برای مدت ۴ روز قبل و ۱۵ روز پس از چالش با ویروس لکه سفید با این جیره تغذیه شدند (روزانه ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم به ازای هرگرم وزن میگو ). افزایش باز ماندگی (۸۰٪–۴۰٪) در تیمار حاوی بالاترین میزان عصاره مشاهده شد (Ramesthangam و Ramasamy، ۲۰۰۷). همچنین افزایش بازماندگی میگوی ببری سیاه پس از تجویز مخلوطی از ویروس لکه سفید و عصاره گیاهانی مثل به بنگالی[5]، چمن برمودا[6]، مریم گلی وحشی[7] و گیاه سنگ شکن مشاهده شده است (Balasubramanian و همکاران، ۲۰۰۷). سازوکار فعالیت ضدویروسی عصاره این گیاهان در برابر ویروس لکه سفید مشخص نیست. ادعا شده است که یک پپتید بیان شده توسط فاژ در شرایط In vivo در خرچنگ درازآب شیرین و در

1.*Sargassum polycystum*
2.*Pongamia pinnata*
3.herpes simplex virus
4.bis(2-methylheptyl)phthalate
5.Aegle marmelos
6.Cynodon dactylon
7.Lantana camara

شرایط آزمایشگاهی در کشت اولیه ارگان لنفوئیدی میگو در برابر ویروس لکه سفید مؤثر است. (Yi و همکاران،۲۰۰۳). تزریق رنای دورشته‌ای در میگوی سفید غربی بسته به میزان ویروس تلقیح شده ایجاد محافظت می‌کند (Robalino و همکاران، ۲۰۰۴). میزان محافظت ایجاد شده بین ژن‌های هدف رناهای دورشته‌ای متفاوت است. رناهای دورشته ای مرتبط با پروتئین‌های ویروسی VP28، VP281، ژن پروتئین کیناز ویروس لکه سفید و ژن پروتئین فلورسانس سبز در میگوی چینی در برابر ویروس لکه سفید محافظت ایجاد می‌کنند (Kim و همکاران، ۲۰۰۷). تزریق رنای تداخل کننده کوتاه پروتئین‌های VP15 و VP28 در میگوی ببری سیاه مفید واقع شده است (Westenberg و همکاران، ۲۰۰۵). چندین تزریق از رنای تداخل کننده کوتاه VP28 باعث تأخیر و کاهش بروز تلفات در میگوهای ژاپنی مبتلا به ویروس لکه سفید شد که می‌تواند به علت ممانعت از تکثیر ویروس باشد (Xu و همکاران، ۲۰۰۷).

**د-۶-۳- واکسیناسیون یا افزایش مقاومت/قدرت تحمل**

اصطلاح واکسیناسیون در میگو به دلیل وجود ایمنی ذاتی شاید واژه مناسبی نباشد (Smith و همکاران، ۲۰۰۳). به هر حال این واژه در مقالات مختلفی به کار برده شده است. مقاومت شامل دفاع، پاکسازی فعالیت‌ها و درنهایت حذف ویروس است و تحمل دلالت بر عفونت پایدار دارد که قابل انتقال با یا بدون علایم قابل تشخیص در آسیب شناسی ویروسی است (Flegel، ۲۰۰۱).

در چندین پژوهش، موفقیت ایجاد حفاظت در برابر بیماری لکه سفید در میگوهای مختلف با استفاده از پروتئین‌های ویروسی و یا پروتئین‌های نوترکیب ویروسی VP19، VP26،

VP28، VP31 وVP292 گزارش شده است ( Du و همکاران، ۲۰۰۶a؛ Jha و همکاران،b ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷؛ Namikoshi وهمکاران، ۲۰۰۴؛ Rout و همکاران، ۲۰۰۷؛ Vaseeharan و همکاران، ۲۰۰۶؛ Witteveld وهمکاران، ۲۰۰۴a,b؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۶؛). مدت زمان حفاظت (حداکثر ۷ هفته) و اثر بخشی آن بین پروتئین‌های مختلف ویروسی و پژوهش‌ها متفاوت است. واکسیناسیون با پروتئین‌های نوکلئوکپسیدی مثل VP15 و VP35 مؤثر نبودند (Rout و همکاران، ۲۰۰۷). استفاده ازپروتئین نوترکیب VP28 در جیره غذایی میگوی ببری سیاه و خرچنگ دراز آب شیرین در کاهش تلفات ناشی از ویروس لکه سفید مؤثر بوده است (Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Witteveldt و همکاران،b ۲۰۰۴). اما همین پروتئین در میگوی سفید غربی اثر کمتری داشت (Witteveldt وهمکاران، ۲۰۰۶). چگونگی تولید پروتئین نوترکیب ویروسی VP28 نیزممکن است در اثر بخشی آن مؤثرباشد. بیان پروتئین نوترکیب VP28 در سلول‌های BmN در حفاظت خرچنگ دراز آب شیرین مؤثرتر از بیان آن در باکتری *اشریشیا.کلی* بود (Du و همکاران، ۲۰۰۶a). آنتی بادی مونوکلونال بر علیه پروتئین نوترکیب VP28 یا آنتی بادی پلی‌کلونال در برابر پروتئین‌های نوترکیب VP28+VP19 می‌تواند عفونی‌زایی ویروس لکه سفید راختنی کند (Li, H-X و همکاران، ۲۰۰۵؛ Musthaq و همکاران، ۲۰۰۶؛ Natividad و همکاران، ۲۰۰۷). درجه خنثی سازی آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده در برابر پروتئین VP28 به میزان ویروس تلقیح شده بستگی داشته و کمترین اثر را در شرایط آزمایشگاهی دارا می‌باشد (Natividad و همکاران، ۲۰۰۷). در مقابل بر طبق یافته‌های Robalino و همکاران (۲۰۰۶) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده بر علیه پروتئین VP28 نمی‌توانند عفونی‌زایی ویروس لکه سفید را مهار نمایند و محافظت

مشاهده شده در آزمایش Witteveldt و همکاران (۲۰۰۴b) احتمالاً ناشی از ترکیبات دیگری غیراز آنتی‌بادی‌ها در آنتی‌سرم خرگوش بوده است.

تلقیح ویروس لکه سفید غیرفعال شده با فرمالین به میگوهای ژاپنی، سفید هندی و میگوی سفید غربی سبب القاء محافظت در برابر چالش ویروس لکه سفید می‌گردد ( Bright Singh و همکاران، ۲۰۰۵؛ Melena وهمکاران، ۲۰۰۶؛Namikoshi وهمکاران، ۲۰۰۴) در حالی‌که ویروس غیرفعال شده با حرارت هیچ اثری نداشت (Namikoshi وهمکاران، ۲۰۰۴).

**د-۶-۴- تداخل با ویروس‌های دیگر**

پست لاروها و میگوهای جوان سفید غربی و میگوی آبی[1] آلوده به ویروس نکروز عفونی بافت خونساز وزیرجلدی در چالش با ویروس لکه سفید کاهش تلفات را نشان دادند (Bonnichon و همکاران، ۲۰۰۶؛ Melena و همکاران، ۲۰۰۶؛ Tang و همکاران، ۲۰۰۳). میگوهای بازمانده از شیوع بیماری لکه سفید به ویروس سندروم بدشکلی و کوتولگی[2] نیز آلوده بودند. این محافظت می‌تواند ناشی از القاء ایمنی یا بلوک کردن اجزاء میزبان از قبیل گیرنده‌های سلولی مورد نیاز برای تکثیر ویروس لکه سفید باشد (Tang و همکاران، ۲۰۰۳).

1. *P. stylirostris*

2 .Runt deformity syndrome

### د-۶-۵- محرک‌های ایمنی

جیره غذایی حاوی ترکیبات میکروبی از قبیل بتا ۱و۳ گلوکان استخراج شده از قارچ *شیزوفیلوم کومونه*[1] (Chang و همکاران، ۱۹۹۹ و ۲۰۰۳) لیپوپلی‌ساکارید باکتری *پانتوا آگلومرانس*[2] (Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰) یا عصاره گیاهانی مثل به بنگالی، چمن برمودا و... (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶) سبب بهبود سیستم ایمنی و کاهش تلفات در میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید شد. سازوکار این حفاظت را به فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی نسبت داده‌اند. بهترین نتایج زمانی حاصل می‌شود که محرک‌های ایمنی قبل از در معرض قرارگیری میگو با عامل بیماری‌زا به کار گرفته شوند. استفاده زیاد یا مداوم محرک های ایمنی ممکن است علاوه بر این‌که مفید نباشدحتی سبب اثرات منفی نیز شود (Horowitz و Horowitz، ۲۰۰۱).

### د-۶-۶- پپتیدهای ضدمیکروبی[3]

گزاراشات معدودی فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی در برابر ویروس‌های مختلف را توصیف نموده‌اند. پپتیدهای ضدمیکروبی قسمتی از ایمنی ذاتی میگوها می‌باشند. در۲ مطالعه ویروس لکه سفید در شرایط آزمایشگاهی با یک پپتید ضدمیکروبی صناعی به نام میتیلین[4] قبل از تلقیح به میگوی معمولی[5] گرمخانه گذاری شد. تلفات این میگو در مقایسه با قبل از استفاده از پپتید میتیلین کمتر بود (Dupuy و همکاران، ۲۰۰۴؛ Roch و همکاران، ۲۰۰۸).

1 *Schizophyllum commune*
2. *Pantoea agglomerans*
3 .Antimicrobial peptides (AMP)
4 .Mytilin
5 .Palaemon serratus

**د-۶-۷- دمای آب**

تلفات میگوها یا خرچنگ‌های مبتلا به ویروس لکه سفید در دمای آب بالاتر (۳۳-۳۲ درجه سانتی‌گراد) یا کمتر از (۱۵> درجه سانتی‌گراد) از دمای مطلوب کاملاً متوقف می‌شود (Du و همکاران، ۲۰۰۶b؛ Guan و همکاران،۲۰۰۳؛ Jiravanichpaisal وهمکاران، ۲۰۰۴؛Vidal وهمکاران، ۲۰۰۱). مکانیسم‌های پیشنهادی در این موارد عبارتند از کاهش تکثیر ویروس (Du و همکاران، ۲۰۰۶b) کاهش بار ویروسی (Granja و همکاران، ۲۰۰۶) آپوپتوزیس (Granja و همکاران، ۲۰۰۳) و تغییر در بیان ژن‌های ویروس لکه سفید (Vidal وهمکاران، ۲۰۰۱).

توجه به این نکته مهم است که روش‌های چالش با ویروس لکه سفید در پژوهش‌های ذکر شده متفاوت است. تلقیح ویروس با روش‌های تزریق داخل عضلانی، غوطه وری در سوسپانسیون ویروسی یا تغذیه با بافت آلوده به ویروس انجام شد. علاوه بر این میزان ویروس عفونی تلقیح شده به هر میگو نیز مشخص نبود. این اختلافات، مقایسه نتایج تحقیقات را غیر ممکن می‌سازد و نیاز به استاندارد سازی بیشتری احساس می‌شود.

# فصل سوم

# مواد و روش کار

# فصل سوم: مواد و روش کار

## الف- مواد و روش کار

### الف-۱- مواد و وسایل مورد نیاز

#### الف-۱-۱- مواد

آب مقطر (داروسازی جابربن حیان، ایران)، آگار آگار (مرک، آلمان)، آگارز (فرمنتاس[1]، آمریکا)، آمونیوم پرسولفات (گیبکو[2]، اسکاتلند)، آمپی سیلین (داروسازی جابربن حیان، ایران)، اتانول (مرک، آلمان)، سیف استین (گیبکو، اسکاتلند)، استات سدیم (گیبکو، اسکاتلند)، استون (مرک، آلمان)، اسید استیک گلاسیال (مرک، آلمان)، اسیدکلریدریک (مرک، آلمان)، اکریل آمید (گیبکو، اسکاتلند)، ایزوپروپانول (مرک، آلمان)، بروموفنل بلو (مرک، آلمان)، بیس آکریل آمید

1. Fermentas
2. GIBCO

(گیبکو، اسکاتلند)، پلی اتیلن گلیکول (سیگما[1]، آمریکا)، تریپتون (سیگما، آمریکا)، تریس (گیبکو، اسکاتلند)، روغن معدنی (سیگما، آمریکا)، عصاره مخمر (مرک، آلمان)، فرمالین (مرک، آلمان)، کلرید پتاسیم (مرک، آلمان)، کلرید سدیم (مرک، آلمان)، کلرید منیزیم (مرک، آلمان)،۴ کلرونفتول آمین (سیگما، آمریکا)، گلیسین (سیگما، آمریکا)، گلوکز (مرک، آلمان)، گلیسرین (مرک، آلمان)، متانول (مرک، آلمان)، تمد[2] (گیبکو، اسکاتلند)، سدیم دودسیل سولفات[3] (گیبکو، اسکاتلند)، بتامرکاپتواتانول (مرک، آلمان)، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (سیناژن، ایران)، EDTA (گیبکو، اسکاتلند)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات[4] (مرک، آلمان)، فسفات دی سدیک[5] (مرک، آلمان)، سدیم بی کربنات[6] (مرک، آلمان)، سدیم هیدروژن کربنات[7] (مرک، آلمان)، سود (مرک، آلمان)، پودر شیر پس چرخ[8] (مرک، آلمان)، دی اتیل پیروکربنات (سیگما، آمریکا)، تترا متیل بنزیدین (پانریک، اسپانیا)، ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید[9] (سیناژن، ایران)، ، آنزیم Taq DNA پلیمراز (فرمنتاس، لیتوانی)، آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاس، لیتوانی)، مارکر وزنی پروتئین (ویوانتیس[10]، مالزی)، مارکر وزنی DNA (فرمنتاس، لیتوانی)، وکتور (پلاسمید) $pMAL\text{-}C_2X$ (بیولبس، انگلستان)، کیت استخراج پلاسمید[11] (ویوانتیس، مالزی)، کیت استخراج ژن از ژل[12] (بایونیر، کره جنوبی)، آنزیم

1.Sigma
2. TEMED
3.Sodium dodecyl sulfate (SDS)
4. $KH_2PO_4$
5. $Na_2HPO_4$
6. $Na_2Co_3$
7.$NaHco_3$
8. Skim milk
9.IPTG (isopropylthio-β-galactoside)
10.Vivantis
1. Gene JET Plasmid Miniprep kit
2. Qia quick gel extraction kit

*Sal I*(ینابایوساینس،آلمان)، آنزیم*Hind II* (ینابایوساینس، آلمان)، باکتری *E. coli TG1* (سیناژن، ایران) هماتوکسیلین (مرک، آلمان)، ائوزین (مرک، آلمان)، فلوکسین ( مرک، آلمان)، پارافین بلوک (مرک، آلمان)،سیست آرتمیا (اینوی[1]، بلژیک).

**الف-۱-۲- وسایل مورد نیاز**

اتوکلاو (سوپرکلاو، ژاپن)، انکوباتور شیکردار (فن آوران سهند آذر، ایران)، اسپکتروفتومتر (یونیکو، آمریکا)، بن ماری (ممرت، آلمان)، پاورسوپلای (پایاپژوهش، ایران)، تانک الکتروفورز افقی (پایاپژوهش، ایران)، تانک الکتروفورز عمودی (پایاپژوهش، ایران)، ترازوی دیجیتال سه صفر (ANDGF، ژاپن)، ترمال سایکلر (کوربت[2]، استرالیا)، فریزر ۷۰- (GFL، آلمان)، سانتریفوژ یخچال دار (اپندروف، آلمان)، سمپلرتک کانالـه (گیلسون[3]، فرانسه)، مایکروویو (LG، کره)، میکروسانتریفوژ (سیگما، آلمان)، pH متر (Ts تکنولوژی، ایران)، میکروسکوپ فلورسنت (اولیمپوس، ژاپن)، استریومیکروسکوپ ( نیکون، ژاپن)، میکروسکوپ مجهز به CCD ( اولیمپوس، ژاپن)، دستگاه آماده سازی بافت (شاندون، آمریکا)، میکروتوم دوار ( شاندون، آمریکا)، فور (مازندلاب، ایران)، حمام بافت(مازندلاب، ایران)، آکواریوم( ۳۰لیتری، شیشه‌ای)، .

1. Inve
2. Corbet
3. Gilson

**الف-۲- روش تهیه بافرها و محلول های مورد استفاده و مواد تشکیل دهنده آن ها**

**الف-۲-۱- روش تهیه محلول تثبیت کننده دیویدسون**

برای ساختن یک لیتر محلول دیویدسون ۳۳۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ با ۲۲۰ میلی‌لیتر فرمالین (فرمالدئید ۳۷٪) و ۱۱۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شده و ۵۳۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌شود. این تثبیت کننده را می توان در دمای آزمایشگاه به مدت طولانی نگهداری نمود.

**الف-۲-۲- روش تهیه آب مقطر RNase free**

میزان ۰/۱ درصد دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تزریقی افزوده و به خوبی مخلوط گردید. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد و در نهایت به منظور غیرفعال کردن DEPC، محلول به‌دست آمده اتوکلاو شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲-۳- تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز**

برای تهیه بافر بارگذاری، ۹ میلی‌گرم رنگ بروموفنل بلو را به ۶ میلی لیتر گلیسیرین استریل افزوده وحجم نهایی با آب مقطر به۱۰ میلی لیتر رسانده شد. گلیسرین موجود در بافر بارگذاری موجب سنگینی نمونه می‌شود تا در ته چاهک قرار گیرد. حرکت رنگ بروموفنل بلو روی ژل، مبین حرکت نمونه می‌باشد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲-۴- روش تهیه بافر TAE**

بافر TAE به صورت محلول ذخیره[1] (غلظت X ۵۰ ) تهیه شده و دردمای اتاق نگهداری و سپس با غلظت X ۱ مصرف گردید. بافر ۱X آن محلول ۱ میلی مولار EDTA، ۴۰ میلی مولار تریس و ۲۰ میلی مولار اسید استیک است. برای تهیه محلول ذخیره X ۵۰، ۲۴۲ گرم تریس (MW=۱۲۱/۱۱۴ g/mol) با ۵۷/۱ میلی لیتر اسید استیک (MW=۶۰/۰۵ g/mol) و ۱۸/۶ گرم EDTA (MW=۳۷۲/۲۴ g/mol) مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۵- روش تهیه محیط لوریا برتانی۲ (LB)**

برای تهیه محیط LB مایع، ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم کلرید سدیم در آب مقطر با حجم نهایی یک لیتر جوشانده و اتوکلاو گردید. برای تهیه محیط LB جامد به میزان ۱۵ گرم در لیتر، آگار آگار به آن افزوده شد و پس از جوشاندن اتوکلاو گردید.

برای تهیه محیط LB گلوکزدار، به ازاء هر میلی لیتر محیط LB مایع، ۲۰ میکرولیتر از محلول ذخیره گلوکز اضافه شد (محلول ذخیره گلوکز با غلظت ۲ مولار تهیه شده و به وسیله فیلتر ۰/۲ میکرون پالایش گردید).

برای تهیه LB جامد حاوی آمپی سیلین پس از رسیدن دمای محیط کشت اتوکلاو شده به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به ازاء هر میلی لیتر محیط، یک میکرولیتر از آمپی‌سیلین ( با غلظت µg/µl ۱۰۰) اضافه شد.

1.Stock solution

2. Luria Bertani

به منظور تهیه آمپی‌سیلین مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر آمپی‌سیلین در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و پس از تقسیم بندی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۶- روش تهیه محلول ۰/۱ مولار IPTG[1]**

به منظور تهیه محلول ۰/۱ مولار IPTG، ۲۸۳ میلی گرم IPTG (MW=۲۸۳g/mol) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شدو به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی پالایش گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۷- تهیه محلول های لازم برای SDS-PAGE**

**الف-۲- ۷-۱- روش تهیه محلول ۳۰ درصد اکریل آمید**

توزین در این روش وزنی می‌باشد به این منظور به ۳۰ گرم آکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید، آب مقطر اضافه شد تا وزن نهایی آن به ۱۰۰ گرم برسد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه روی همزن قرار داده شد. این مخلوط به نور حساس است و پس از تهیه باید دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.برای این منظور محلول حاصل را در ظرف تیره که دور آن نیز با فویل آلومینیوم کاملاً پوشیده شده بود نگهداری شد. (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

1. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

**الف-۲- ۷-۲- روش تهیه بافر حرکت دهنده[1] (5x)**

برای تهیه بافر حرکت دهنده، ۱۵/۱۵ گرم تریس (۰/۱۲۵ مولار)، ۷۲ گرم گلایسین (۰/۹۶ مولار) و ۵ گرم سدیم دودسیل سولفات را در مقداری آب مقطر مخلوط و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۷-۳-روش تهیه بافر نمونه‌ی[2] X ۲ جهت SDS – PAGE**

برای تهیه این بافر، ۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، ۲ میلی لیتر تریس ۰/۵ مولار با pH = ۶/۸ ، ۱ میلی لیتر بتا مرکاپتواتانول (2 ME) ، ۵ میلی گرم بروموفنول بلو ، ۱ میلی لیتر گلیسرول و در آخر ۲ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد با هم مخلوط گردید. ترتیب ریختن اجزاء مهم می‌باشد. مخلوط خوب ورتکس شد تا جهت استفاده آماده شود (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۷-۴- روش تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو**

به منظور تهیه‌ی محلول رنگ آمیزی ۰/۱ گرم پودر کوماسی بلو، ۵۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و ۴۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر با هم مخلوط شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

1. Runing buffer
2. Sample buffer

**الف-۲- ۷-۵- روش تهیه محلول رنگ بر**

به منظور تهیه محلول رنگ بر، ۳۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و ۶۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر با هم مخلوط گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**الف-۲- ۷-۶- مواد و مقادیر لازم برای ساخت ژل های جدا کننده[1] و متراکم کننده[2]**

به منظور تهیه ۳۰ میلی‌لیتر ژل پلی‌آکریل‌آمید جدا کننده ۱۰درصد، مواد لازم طبق جدول ۳-۱ با یکدیگر مخلوط و جهت تهیه ۱۰ میلی‌لیتر ژل پلی‌آکریل‌آمید متراکم کننده ۴ درصد، مواد لازم طبق جدول ۳-۲ با یکدیگر مخلوط گردید (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

1. Separating gel
2. Stacking gel

**جدول ۳-۱: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل جدا کننده**

(Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲)

| اجزاء | مقدار(ml) |
|---|---|
| آب | ۱۱/۹ |
| آکریل آمید ۳۰ درصد | ۱۰/۰ |
| تریس یک مولار با pH = ۸/۸ | ۷/۵ |
| سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد | ۰/۳ |
| آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد | ۰/۳ |
| تمد | ۰/۰۱۲ |

**جدول ۳-۲: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل متراکم کننده**

(Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲)

| اجزاء | مقدار(ml) |
|---|---|
| آب | ۶/۸ |
| آکریل آمید ۳۰ درصد | ۱/۷ |
| تریس یک مولار با pH= ۶/۸ | ۱/۲۵ |
| سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد | ۰/۱ |
| آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد | ۰/۱ |
| تمد | ۰/۰۱ |

**الف-۲-۸- روش تهیه PBS(1X)**

بافر نمکی فسفات (PBS)، محلولی متشکل از ۱۳۷ میلی‌مولار نمک طعام، ۲/۷ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۴/۳ میلی‌مولار فسفات دی سدیک و ۱/۴ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات می‌باشد.به منظور تهیه‌ی این محلول، ۸ گرم نمک طعام (MW=۵۸/۴۴g/mol)، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم (MW=۷۴/۵۶g/mol)، ۱/۴۴ گرم فسفات دی سدیک (MW=۱۴۱/۹۶g/mol) و ۰/۲۴ گرم پتاسم دی هیدروژن فسفات (MW=۱۳۶/۰۹g/mol)، به مقداری آب اضافه و حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

## ب- روش کار

### ب-۱- مراحل پژوهش

تهیه نمونه میگو آلوده به ویروس لکه سفید

↓

استخراج دنا از نمونه

↓

طراحی پرایمر بر اساس توالی ژن VP28 ویروس لکه سفید

↓

انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

↓

کلونینگ ژن VP28 در وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X

↓

غربالگری کلون‌های حاوی ژن VP28 با استفاده از پی‌سی‌آر و هضم آنزیمی و تعیین توالی

↓

بررسی بیان پروتئین VP28 با استفاده از روش SDS-PAGE

↓

بیان پروتئین VP28 در باکتری TG1

↓

غیرفعال نمودن باکتری حاوی پروتئین VP28بیان شده

↓

کپسوله کردن زیستی باکتری در ناپلی آرتمیا

↓

تغذیه پست لارو میگوی سفید غربی با ناپلی آرتمیای نوترکیب

↓

چالش گروه‌های میگو با ویروس لکه سفید

↓

بررسی درصد نسبی بقاء و مقایسه تیمارها با یکدیگر

### ب-۱-۱- نمونه گیری و استخراج دنا

به منظور دستیابی به ویروس لکه سفید برای استفاده در این پژوهش، طی بازدید از مزارع پرورش میگوی استان خوزستان در منطقه چوئبده آبادان (خرداد تا مهرماه ۱۳۹۰) میگوهای بیمار و دارای علائم بالینی از سطح مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان انتخاب گردید، پای شنا، نیمی از آبشش ها و قسمتی از عضله میگو به منظور بررسی آلودگی به ویروس لکه سفید در الکل ۹۶ درجه نگهداری شد و باقیمانده بافت میگو ،پس از تأیید آلودگی، به عنوان منبع ویروس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### ب-۱-۲- استخراج دنا

مقداری از نمونه (آبشش و پای شنا) درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شده، ۰/۶ میلی لیتر از محلول دی تب[1] (ژن ریچ، تایوان ) به آن اضافه شد. توسط گریندرهای یک بار مصرف نمونه درون آن خرد گردیده، در حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس ازخارج نمودن میکروتیوب از حمام آب گرم به طور مختصر مجدداً همزنی انجام شده، ۰/۷ میلی لیتر کلروفرم به آن اضافه گردیده به مدت ۲۰ ثانیه مخلوط شده و بعد از آن ۵ دقیقه با سرعت۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سی‌تب[2] (ژن ریچ، تایوان ) و ۹۰۰ میکرولیترآب دوبار تقطیر به آن افزوده شد.

1. DTAB
2 . CTAB

میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسد. به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. با دقت مایع رویی بیرون ریخته شده و با ۱۵۰ میکرولیتر ماده حلال[1] (ژن ریچ، تایوان ) پلت ایجاد شده در ته میکروتیوب دوباره حل گردیده، به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن تا رسیدن به دمای اتاق، خنک شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شده، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه گردید. بعد از همزنی مختصر، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شستن پلت با اتانول ۷۰٪ به مقدار ۲۰۰ میکرولیترانجام شد و در آخر محلول فوقانی خارج شدو پلت موجود در کف میکروتیوب در دمای اتاق خشک شد. در پایان ۵۰ میکرولیتر آب DEPC به میکروتیوب افزوده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**ب-۱-۳- پرایمر**

پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده پروتئین VP28 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Jeroen Witteveldt (۲۰۰۶) انتخاب گردید و به منظور انجام کلونینگ در انتهای'۵ این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر SalI و HindIII نیز قرارداده شد.

1. Dissolve solution

### ب-۱-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تکثیر ژن $VP_{28}$ بوسیله پی‌سی‌آر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیترژنوم الگو، ۰/۴میکرولیتر (۲/۵واحد در میکرولیتر) آنزیم Pfu، ۵ میکرولیتر بافر آنزیم Pfu، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیترکلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۳۸/۱میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل انجام شد(جدول ۳-۳).

**جدول ۳-۳- مواد و مقادیر استفاده شده در برنامه تکثیر ژن VP28**

| | |
|---|---|
| دنا | ۲ µl |
| بافر آنزیم Pfu | ۵ µl |
| کلرید منیزیوم(۵۰ mM) | ۱/۵µl |
| dNTP mixes (10 mM) | ۱ µl |
| پرایمرF (۲۰ pmoL/µl) | ۱ µl |
| پرایمرR (۲۰ pmoL/µ) | ۱ µl |
| آنزیم Pfu | ۰/۴ µl (۲/۵ U/ µl) |
| آب دو بار تقطیر ($ddH_2O$) | ۳۸/۱ µl |
| حجم نهایی | ۵۰ µl |

### ب-۱-۴-۱- برنامه حرارتی پی‌سی‌آر

واکنش پی‌سی‌آر با برنامه دمایی دناتوره شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه بود. در پایان یک مرحله دمایی ۷۲ درجه نیز به مدت ۷ دقیقه اجرا گردید.این برنامه در جدول۳-۴ نشان داده شده است.

**جدول ۳-۴- برنامه حرارتی PCR ژن VP28**

| سیکل‌ها | دما (°C) | زمان | تعداد سیکل‌ها |
|---|---|---|---|
| سیکل اول: دناتوره شدن ابتدایی | ۹۵°C | ۲′ | ۱ |
| سیکل دوم: دناتوره شدن | ۹۴°C | ۴۵″ | ۳۵ |
| سیکل دوم: اتصال پرایمرها | ۴۸°C | ۱′ | |
| سیکل دوم: بسط | ۷۲°C | ۲′ | |
| سیکل سوم: بسط نهایی | ۷۲°C | ۷′ | ۱ |

**ب-۱-۴-۲- بررسی محصول پی‌سی‌آر با الکتروفورز در ژل آگارز**

مقدار ۰/۸ گرم از پودر آگارز وزن شده و در ۸۰ میلی‌لیتر بافر TAE (1X) در یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حل و جوشانده شد. پس از رسیدن دمای ژل به حدود ۵۰ درجه سانتیگراد، مقدار ۲/۸۳ میکرولیتر از رنگ سیف استین به محلول اضافه و سپس ژل در قالب مخصوص از پیش آماده شده ریخته شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

پس از تهیه ژل آگارز، ۵ میکرولیتر از محصول پی سی آر با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و درون ژل بارگذاری گردید. همچنین جهت اطمینان از صحت طول قطعه تکثیر شده از نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی استفاده گردید.

پس از پایان الکتروفورز جهت مشاهده باندهای تفکیک شده، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور[1] قرار داده شد و با تابش نور فرابنفش[2] بر روی ژل، باند دنای تکثیر یافته از نظر صحت طول مورد بررسی قرار گرفت.

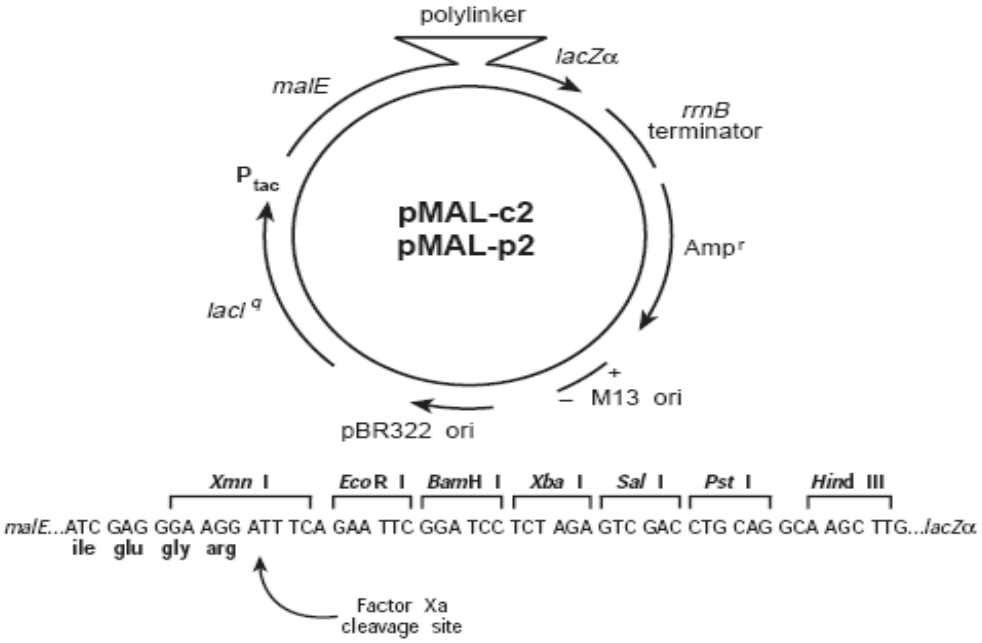
**ب-۱-۴-۳- خالص سازی محصول پی‌سی‌آر**

برای خالص سازی محصول پی‌سی‌آر برای انجام آزمایشات بعدی (هضم آنزیمی و کلونینگ) از ژل آگارز یک درصد و کیت استخراج از روی ژل شرکت بایونیر[3] و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید و محصول در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

**ب-۱-۵- تکثیر و خالص سازی وکتور**

در این تحقیق به منظور کلونینگ و بیان ژن VP28، از وکتور بیانی پروکاریوتی pMal-c2X ، محصول شرکت نیوانگلندبیولب[4] استفاده شد (شکل ۳-۱).

1. Transilluminator
2 . UV
3. AccuPrep® Gel Purification Kit
4 . New England Biolabs




**شکل ۳-۱- نقشه پلاسمید pMal-c2X و خصوصیات آن**

به منظور تکثیر و ازدیاد وکتور pMAL-c2X، این وکتور بوسیله ترانسفورماسیون و با استفاده از روش شوک حرارتی و به کمک کلرید کلسیم به باکتری انتقال داده شد. ترانسفورماسیون طی مراحل زیر انجام شد.

- ابتدا باکتری *E. Coli* سویه TG1 در محیط LB مایع به صورت شبانه در دمای ۳۷°C با شیک متوسط کشت داده شد.
- کشت شبانه باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ به محیط LB مایع تازه اضافه گردید و در دمای ۳۷°C با شیک متوسط انکوبه شد تا $OD_{600}$ آن به ۰/۶– ۰/۴ رسید.
- به منظور تهیه رسوب از باکتری با تراکم مورد نظر، ۱/۵میلی‌لیتر ازکشت مایع حاوی باکتری درون میکروتیوب ریخته شد و با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳

دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی کاملا تخلیه و دور ریخته شد.

- به رسوب حاصل ۳۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه گردید. بعد از پی‌پت کردن و به دست آمدن یک سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۳۰ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد.
- سپس میکروتیوب با دور سرعت۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
- محلول رویی کاملا تخلیه و دور ریخته شد.
- در این مرحله به رسوب حاصل۲۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه گردید و بعد از پی‌پت کردن و ایجاد یک سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۳۰ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد.
- مجدداً میکروتیوب با دور سرعت۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
- محلول رویی کاملا تخلیه و دور ریخته شد.
- به رسوب موجود در میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه بر روی رک یخ در یخچال قرار داده شد. در این مرحله باکتری‌ها مستعد دریافت پلاسمید هستند.

- پس از مدت زمان ۷ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پذیرا[1] به آهستگی به ۱ میکرولیتر پلاسمید بر روی یخ افزوده شد و به آرامی پی‌پت کرده تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید.
- میکروتیوب حاوی باکتری های پذیرا و پلاسمید به مدت ۳۰ دقیقه دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد ( دمای یخچال) روی رک یخ قرار داده شد.
- میکروتیوب به مدت ۹۰ ثانیه به بن‌ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.
- بلافاصله پس از مدت زمان ۹۰ ثانیه سوسپانسیون به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد و در نهایت به میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید۹۰۰ میکرولیتر محیط LB بدون آمپی‌سیلین اضافه گردید تا به حجم یک میلی‌لیتر برسد. میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید به مدت یک ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد با شیک متوسط انکوبه گردید.
- در پایان یک ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بر روی محیط LB جامد حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین در هر میلی‌لیتر محیط منتقل و به صورت کشت سفره‌ای گسترش تهیه و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.
- باقیمانده سوسپانسیون با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده،۸۰۰ میکرولیتر از مایع رویی تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر باقیمانده نیز برروی محیط جامد حاوی

1 .Competent

آمپی‌سیلین به صورت سفره‌ای کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شد.

- از تعداد کل کلونی‌های پدیدار شده تعداد ۲۰ کلونی برای اطمینان از حضور وکتور انتخاب و در محیط LB جامد آمپی‌سیلین‌دار به‌صورت خطی کشت داده شدند.

**ب-۱-۶- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت**

یکی از کلونی‌های کشت داده شده انتخاب و برای استخراج پلاسمید با کیت استفاده گردید. در این تحقیق از کیت استخراج پلاسمید شرکت ویوانتیس (مالزی) استفاده شد.

**ب-۱-۷- مراحل کلونینگ**

**ب-۱-۷-۱- هضم آنزیمی**

برای انجام کلونینگ یعنی وارد کردن ژن VP28 به وکتور pMal-c2X ، لازم بود که وکتور به فرم خطی تبدیل شود. این عمل باید به گونه‌ای صورت می‌گرفت که وکتور و ژن مورد نظر دارای انتهاهای مکمل بوده و به راحتی به هم متصل شوند. به همین جهت بر روی هر دو محصول (وکتور و ژن) عمل هضم آنزیمی صورت گرفت. برای هضم آنزیمی ژن VP28 و وکتور با توجه به طراحی پرایمر، از آنزیم های محدود کننده *Hind* III و *Sal* I استفاده شد. به این منظور در واکنش‌های هضم تکی پلاسمید و در یک واکنش هضم مضاعف ژن VP28 هضم شدند. واکنش هضم با استفاده از ترکیبات ذکر شده در جدول ۳- ۵ و در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت.

**جدول ۳-۵- ترکیبات واکنش هضم مضاعف ژن VP28**

| اجزاء | مقدار(میکرولیتر) |
|---|---|
| محصول PCR خالص VP28 | ۷ |
| بافر(2X) *Tango* | ۴ |
| آنزیم *Sal I* | ۱ ( ۱۰ واحد) |
| آنزیم *Hind I I I* | ۱ (۱۰ واحد) |
| آب DEPC | ۷ |
| حجم نهایی | ۲۰ |

به مخلوط فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از هضم، کارآیی واکنش با الکتروفورز ۱ میکرولیتر از ژن هضم شده مورد تائید قرار گرفت (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

به منظور هضم پلاسمید از روش هضم تکی از ترکیب زیر ستفاده گردید:

**جدول ۳-۶- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم Sal I**

| اجزاء | مقدار(میکرولیتر) |
|---|---|
| پلاسمید خالص | ۱۰ |
| بافر(10X) B4 | ۲ |
| آنزیم Sal I | ۱ (۱۰ واحد) |
| آب DEPC | ۷ |
| حجم نهایی | ۲۰ |

به مخلوط فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. کارایی واکنش با الکتروفورز ۱ میکرولیتر از پلاسمید هضم شده مورد تأیید قرار گرفت. در مرحله بعد پلاسمید هضم شده با استفاده ازکیت خالص سازی شرکت بایونیر خالص شد و برای هضم با آنزیم*Hind* III استفاده شد. واکنش هضم با این آنزیم نیزطبق جدول ۳-۷ انجام شد.

**جدول ۳-۷- ترکیبات واکنش هضم پلاسمید با آنزیم Hind III**

| اجزاء | مقدار(میکرولیتر) |
|---|---|
| پلاسمید هضم شده باآنزیم Sal I و خالص شده | ۱۰ |
| بافر(10X)B2 | ۲ |
| آنزیمHind III | ۱ (۱۰واحد) |
| آب DEPC | ۷ |
| حجم نهایی | ۲۰ |

به مخلوط فوق ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شده به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

**ب-۱-۷-۲-اتصال**[1]

برای اتصال محصول پی‌سی‌آر و پلاسمید به یکدیگر، هر دو محصول هضم شده (محصول پی‌سی‌آر و پلاسمید) با استفاده از کیت خالص سازی شرکت بایونیر، خالص شدند. میزان دنا و پلاسمید هضمی تخمین زده شدند و اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز T4 به مدت۷۰ دقیقه در دمای ۲۲درجه سانتی‌گراد و سپس یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از سپری شدن زمان فوق برای غیرفعال کردن آنزیم از دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

1. Ligation

دقیقه استفاده شد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲). سپس محصول اتصال با فرض تشکیل پلاسمیدهای حلقوی حاوی ژن VP28 برای ترانسفورماسیون بکار رفت.

**جدول ۳-۸- ترکیبات واکنش اتصال ژن VP28و پلاسمیدpMal-c2X**

| اجزاء | مقدار(میکرولیتر) |
|---|---|
| محصول PCRخالص(VP28) | ۱/۵ |
| پلاسمید خالص | ۱۱ |
| آنزیم T4 ligase | ۱ ( ۵ واحد) |
| بافر Ligase | ۱/۵ |
| حجم نهایی | ۱۵ |
| روغن معدنی | ۲۰ |

**ب-۱-۷-۳- ترانسفورماسیون**

ترانسفورماسیون طبق روشی که قبلاً شرح داده شده انجام گرفت. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال استفاده گردید.

**ب-۱-۷-۴- غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون**

پس از انجام ترانسفورماسیون ، ۱۰ عدد از کلونی‌های ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن VP28 که بر روی محیط حاوی آمپی‌سیلین رشد کرده بودند، انتخاب شده و به صورت خطی

کشت داده شدند. برای بررسی حضور پلاسمید حاوی ژن VP28 در ایـن کلـونی‌هـا، از دو روش غربالگری شامل پی‌سی‌آر و بررسی بیان پروتئین استفاده گردید.

**ب-۱-۷-۴-۱- غربالگری کلون ها با روش پی‌سی‌آر**

در ابتدا کلونی‌ها در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک به روش ۴ قسمتی برای مـدت یک شب کشت شدند. روز بعد یک کلونی کوچک به همراه ۲۴ میکرولیتـر آب مقطـر درون یـک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سـانتی‌گـراد قرار گرفت. پس از آن میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مـدت ۱ دقیقـه سـانتریفوژ گردید.در نهایت ۱ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان الگو برای انجام پی‌سی‌آر و تکثیـر ژن VP28 در حجم ۵۰ میکرولیتر به کار رفت.

**جدول ۳-۹- مواد و مقادیر استفاده برای تکثیر ژن VP28**

| | |
|---|---|
| دنا | ۱ µl |
| بافر PCR (۱۰ X) | ۵ µ |
| کلرید منیزیوم(۵۰ mM) | ۱/۵µl |
| dNTP mixes (10 mM) | ۱ µl |
| پرایمر F (۲۰ pmoL/µl) | ۱ µl |
| پرایمر R (۲۰ pmoL/µ) | ۱ µl |
| آنزیم Taq DNA Polymerase | ۰/۵ µl (۲/۵ U) |
| آب دو بار تقطیر ($ddH_2O$) | ۳۹ µl |
| حجم نهایی | ۵۰ µl |

برنامه دمایی برای انجام پی‌سی‌آر مشابه با برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن VP28 بود (جدول ۳-۴).

**ب-۱-۸- بررسی بیان پروتئین VP28**

**ب-۱-۸- ۱- القاء بیان پروتئین با IPTG**

پس از غربالگری کلون‌های باکتریایی TG1 و تأیید وجود پلاسمیدهای حاوی ژن VP28 به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب VP28، ۳ کلونی انتخاب شد. بدین منظور از این کلونی‌ها به صورت شبانه در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. روز بعد، کشت شبانه باکتری به نسبت ۱/۱۰۰ به محیط LB مایع که حاوی آمپی‌سیلین و گلوکز (۰/۲ درصد) بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش متوسط انکوبه شد تا در $OD_{600}$ کدورت آن به حدود ۰/۵ رسید. بعد از رسیدن OD مورد نظر، قبل از افزودن IPTG ۱ میلی‌لیتر از محیط به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی به دقت تخلیه گردید و پلیت حاصل در دمای ۲۰- نگهداری شد.

برای القاء بیان پروتئین به ۲ میلی‌لیتر باقیمانده از کشت باکتریایی حاوی ژن VP28، به میزان ۳ میکرولیتر از محلول ذخیره ۰/۱ مولار IPTG به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه شد.

کشت باکتری در حضور IPTG برای بیان VP28، تا ۲ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از اتمام مدت انکوباسیون ۲ نمونه تهیه شد به یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر و به میکروتیوب دیگری ۱/۵ میلی‌لیتر باقیمانده منتقل و با سرعت مشابه ذکر شده

سانتریفیوژ گردید. همزمان به عنوان شاهد منفی یک باکتری حاوی پلاسمید pMAL-c2X بدون ژن مورد مطالعه که القاء بیان پروتئین بر روی آن در حضور IPTG، اعمال گردیده بود نیز استفاده شد. این نمونه‌ها در آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

**ب-۱-۸- ۲- SDS-PAGE**

**ب-۱-۸- ۲-۱- آماده سازی قالب**

قالب مورد استفاده جهت پیج[1] ، از دو صفحه شیشه‌ای تشکیل می‌گردد که پس از شست و شوی کامل و چربی زدایی با اتانل، بر روی هم قرار گرفته و در حاشیه آن‌ها فضاسازها قرار داده می‌شدند. به این ترتیب بین دو صفحه شیشه‌ای، فضایی بوجود می‌آمد که در این فضا ژل پلی اکریل آمید ریخته می‌شد. قبل از تهیه ژل و ریختن آن در قالب، ابتدا دو طرف قالب توسط گیره‌هایی ثابت شده و جهت بستن پایین قالب و جلوگیری از نشت ژل به خارج، ژل آگار ۱ درصد تهیه می‌گردید و با استفاده از پیپت پاستور، ژل آگار ذوب شده به آهستگی در قالب ریخته می‌شد به طوری‌که طول آن در حدود ۵ میلی‌متر باشد (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**ب-۱-۸- ۲-۲- تهیه ژل پلی اکریل آمید**

در این بررسی از ژل ۱۰ درصد جهت تفکیک باندهای پروتئینی استفاده شد. جهت تهیه این ژل، مقادیر مورد نیاز از مواد لازم، طبق جدول ۳-۱ با یکدیگر مخلوط شدند. مقدار ۲/۳ از ارتفاع قالب به ژل جدا کننده اختصاص داده شده و یک سوم باقی مانده از قالب جهت ریختن ژل

1 . PAGE

متراکم کننده مورد استفاده قرار گرفت. پس از ریختن ژل جدا کننده در داخل قالب، جهت جلوگیری از رسیدن اکسیژن به سطح ژل، با استفاده از سمپلر مقدار ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آهستگی بر روی سطح ژل ریخته شده و قالب ژل به صورت عمودی و بی حرکت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا آکریل آمید پلیمریزه گردد. سپس با برگرداندن قالب، آب افزوده شده تخلیه و داخل قالب کاملا خشک گردید. سپس اقدام به تهیه ژل متراکم کننده ۴ درصد گردید (جدول ۳-۲). بدین منظور پس از قرار دادن شانه در بین دو شیشه، ژل متراکم کننده به سرعت در قالب ریخته شد و قالب به صورت عمودی و بی حرکت در آزمایشگاه قرار داده شد تا ژل پلی آکریل آمید پلیمریزه گردد.

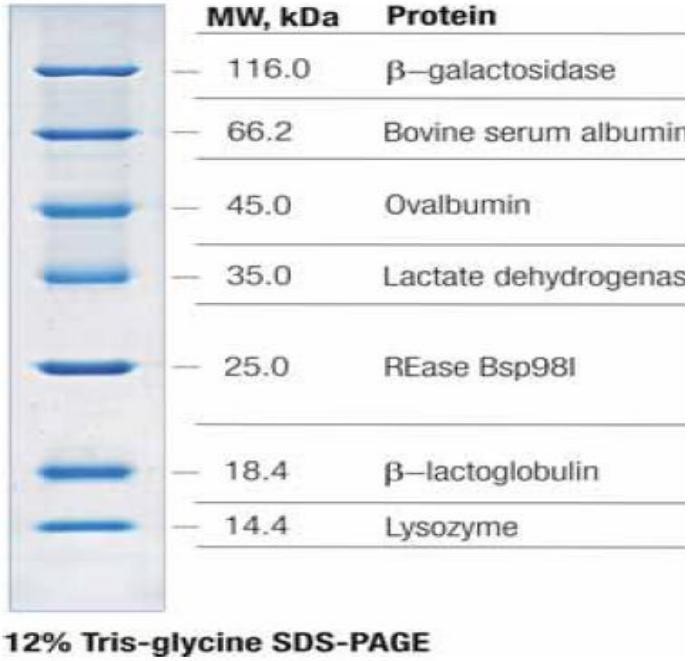
ژل پلی آکریل آمید زنجیره‌های پلیمریزه شده از آکریل آمید هستند که بوسیله بیس آکریل آمید به هم متصل می‌شوند. تمد با کاتالیز تشکیل رادیکال‌های آزاد از آمونیوم پرسولفات، پلیمریزه شدن آکریل آمید و بیس آکریل آمید را تسریع می‌کند. آمونیوم پرسولفات نیز با اکسیژن موجود در مخلوط ترکیب شده و اثر بازدارندگی اکسیژن بر پلیمریزه شدن را خنثی می‌کند (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**ب-۱-۸- ۲-۳- آماده سازی نمونه ها و مارکر وزن مولکولی**

نمونه باکتری قبل از افزودن IPTG با ۵۰ میکرولیتر و نمونه ۰/۵ میلی لیتری بعد از افزودن IPTG با ۱۰۰ میکرولیتراز بافر نمونه[1] مخلوط شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفتند. پس از آن با سرعت ۱۳۰۰۰ دور دقیقه به مدت کوتاهی سانتریفیوژ

1. Sample buffer

شدند.مارکر وزنی مولکولی مورد استفاده در این مطالعه، از ۷ باند پروتئینی درمحدوده ۱۴/۴ کیلـو دالتون تا ۱۱۶ کیلودالتون تشکیل شده بود (شکل ۳-۲).




**شکل ۳-۲- وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در مارکر وزنی مولکولی به همراه الگوی الکتروفورتیک آن‌ها**

### ب-۱-۸- ۲-۴ - آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها

تانک مورد استفاده در SDS-PAGE از نوع عمودی بود که دارای دو مخزن جهت ریختن بافر حرکت دهنده[1] است. ابتدا فضاسازی که در حاشیه پائینی ژل قرار داده شـده بـود و همچنـین شانه از قالب جدا شدند. سپس گیره‌ها به طور موقت بازشده، قالب حاوی ژل به تانک الکتروفورز اتصال داده شد و از دو طرف توسط گیره به دستگاه محکم گردید. برای بارگـذاری نمونـه‌هـا در داخل چاهک‌ها، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها با استفاده از سمپلر به آهستگی در داخل چاهک‌ها تخلیه

1. Running buffer

گردید. در داخل مخزن بالا و پایین، بافر حرکت دهنده ریخته شد. سپس الکترود بالایی تانک به قطب منفی و الکترود پائینی به قطب مثبت منبع برق مستقیم وصل شده و میزان شدت جریان بر روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید.

با این شدت جریان، الکتروفورز در زمانی بین ۳ تا ۴ ساعت انجام شد. با ردگیری مسیر حرکت رنگ برومونفل بلو در ژل، نحوه الکتروفورز و سرعت آن بررسی شد. زمانی که رنگ برومو فنل بلو به پائین ترین سطح خود در ژل رسید، عمل الکتروفورز خاتمه داده شد. قالب ژل از تانک جدا شد و با اهرم کردن فضاسازها بین دو صفحه شیشه‌ای و فشار مختصر، دو صفحه از یکدیگر جدا شدند. به آهستگی ژل الکتروفورز شده از سطح شیشه جدا شد و برای رنگ آمیزی با رنگ آبی کوماسی به کار رفت (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**ب-۱-۸- ۲-۵- رنگ آمیزی پروتئین های الکتروفورز شده با آبی کوماسی**

در این رنگ آمیزی پس از اتمام الکتروفورز، ژل جدا کننده به آرامی از میان شیشه‌ها خارج و در محلول رنگ آبی کوماسی قرار داده و با سرعت متوسط شیک شد. پس از ۱ ساعت رنگ آمیزی، محلول رنگ تخلیه شد و به جای آن محلول رنگبر اضافه شد. رنگبری ژل تا هنگامی ادامه یافت که زمینه ژل روشن شده و باندهای پروتئینی به وضوح مشاهده شدند (Ausubel و همکاران، ۱۹۹۲).

**ب-۱-۹- تعیین توالی ژن کلون شده**

پس از غربالگری کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، سه کلونی که در آزمایش پی‌سی‌آر حاوی ژن بوده و در بررسی بیان نیز پروتئین با وزن مولکولی مورد انتظار را بیان نموده

بودند، انتخاب شده و پلاسمید آن‌ها با کیت، استخراج شد. سپس پلاسمیدها خالص شده و جهت تعیین توالی ژن VP28 به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند تا با استفاده از پرایمرهای ویژه پلاسمید (پرایمرهای M13F-20 و MalE ) از دو جهت تعیین توالی گردند.

**ب-۱-۱۰- تولید ناپلی آرتمیای کپسوله زیستی**

**ب-۱-۱۰- ۱-تولید باکتری TG1 بیان کننده پروتئین GFP**

برای این منظور پلاسمید pEGFPluxABCDEamp حاوی ژن GFP با روشی که قبلاً شرح داده شد به باکتری TG1 ترانسفورم گردید.

**ب-۱-۱۰-۲- بررسی بیان پروتئین GFP**

به منظور بررسی بیان پروتئین GFP توسط باکتری TG1 حاوی پلاسمید و ژن مربوطه طبق روش قبلی از باکتری کشت شبانه تهیه کرده سپس در روز بعد با اضافه کردن به نسبت ۱/۱۰۰ به محیط LB مایع حاوی گلوکز (۰/۲ مولار) و آمپی‌سیلین پس از حدود ۳ ساعت و رسیدن به $OD_{600}$ مناسب مقدار ۳ میکرولیتر از IPTG، ۰/۱ مولار به لوله افزوده شد و پس از دو ساعت بیان پروتئینGFP به وسیله میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید.

**ب-۱-۱۰-۳- تعیین تراکم باکتری برای خوراندن به ناپلی آرتمیا**

پس از تأیید بیان پروتئین GFP از کشت باکتری با $OD_{600}$=1 رقت‌های متوالی به نسبت ۱/۱۰ تهیه و از هر رقت در ۳ پلیت LB جامد حاوی آمپی سیلین به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به

روش سفره‌ای کشت داده شد و تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از کشت مایع با $OD_{600}=1$ بدست آمد.

**ب-۱-۱۰-۴- غیرفعال کردن باکتری**

به این منظور به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری با $OD_{600}=1$ میزان ۰/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷٪ اضافه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس به یخچال منتقل گردید.پس از گذشت ۱۶ ساعت برای بررسی غیرفعال شدن باکتری از نمونه‌ها به نسبت ۱/۱۰۰ در لوله های حاوی محیط LB مایع کشت شبانه تهیه شد.

**ب-۱-۱۰-۵- روش تولید ناپلی آرتمیا**

به منظور تولید ناپلی آرتمیا از سیست‌های آرتمیا (شرکت اینوی، بلژیک) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده میزان ۱/۶ گرم از سیست وزن شد و درون یک زوک پلاستیکی یک لیتری شفاف که حاوی ۸۰۰ میلی‌لیتر آب دریای فیلتر شده استریل با شوری ۲۵ قسمت در هزار بود قرار داده شد. دما بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. همچنین pH آب نیز به وسیله سود در محدوده ۸/۵ –۸ تنظیم شد. توسط یک پمپ هوا و شیلنگ بدون سنگ هوا از قسمت باریک زوک هوادهی صورت گرفت. پس از طی شدن زمان حدود ۲۴ ساعت سیست‌ها هچ شده وناپلی‌ها رها شدند (شکل ۳-۳).



**شکل ۳-۳- هچ کردن سیست های آرتمیا**

**ب-۱-۱۰-۶-جداسازی و شمارش ناپلی آرتمیا**

برای جداسازی ناپلی های هچ شده از پوسته و سیست های هچ نشده مخلوط ناپلی ها را به درون یک استوانه مدرج شیشه‌ای منتقل شد و به جز قسمت انتهایی بقیه بدنه استوانه مدرج توسط یک نایلون تیره ضخیم پوشانده شد. به وسیله یک چراغ مطالعه به قسمت باز استوانه نور تابانده شده، پس از ۵ دقیقه ناپلی‌ها به سمت نور حرکت کردند و در ته استوانه مدرج جمع شدند. به وسیله یک شیلنگ ناپلی‌ها از ته ظرف سیفون شده و به یک ظرف جدید منتقل شدند.

به منظور شمارش تعداد ناپلی در هر میلی‌لیتر حجم نمونه با آب دریای استریل به یک لیتر رسانده شد، همزمان با هوادهی (به دلیل پراکندگی یکسان ناپلی‌ها در محیط) از این میزان ۴ نمونه ۲۵۰ میکرولیتری برداشت شده ابتدا توسط چند قطره لوگل ناپلی‌ها کشته و تعداد ناپلی‌ها در هر نمونه شمارش گردید و تعداد ناپلی ها در هر میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۳-۴).



**شکل ۳-۴- جداسازی ناپلی های آرتمیای هچ شده**

**ب-۱-۱۰-۷-تعیین زمان مورد نیاز برای خوراندن باکتری به ناپلی آرتمیا**

در این مرحله ناپلی‌های آرتمیا ۸ ساعت پس از هچ شدن ( مرحله اینستار۲) با تراکم ۵۰۰ ناپلی در هر میلی لیتر درون ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی آب دریای فیلتر و استریل شده با شوری ۲۵ قسمت درهزار با هوادهی مناسب قرار گرفتند. به این ارلن $10^8$ باکتری غیرفعال به ازای هر میلی‌لیتر افزوده شده و در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه از ناپلی‌ها نمونه گیری شده و میزان پرشدگی دستگاه گوارش ناپلی به وسیله میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

**ب- ۱-۱۱- تولید ناپلی آرتمیای نوترکیب**

بر اساس روش‌های شرح داده شده در بند ب- ۱-۱۰ ناپلی های آرتمیا با تراکم مناسب به دست آمده با باکتری‌های TG1 حاوی پلاسمید نوترکیب (pMal-c2X همراه با ژن VP28)

وپلاسمید غیرنوترکیب (pMal-c2X بدون ژنVP28) و باکتری TG1 بدون پلاسمید مخلوط شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر ناپلی ها سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) شده و به منظور حذف باکتری‌های اضافی توسط فیلتر ۲۵۰ میکرون ناپلی‌ها ۳ بار با PBS شستشو شدند. سپس تا مرحله تغذیه پست لاروهای میگو درون یخچال نگهداری شدند.

**ب-۱-۱۲- ایجاد ایمنی در پست لاروهای میگو**

در این مرحله تعداد ۷۸۰ پست لارو میگوی سفید غربی مرحله ۵ (Pl5) از یکی از مراکز تکثیر واقع در چوئبده آبادان (مرکز تکثیر تولید میگوی اهواز ) خریداری گردید. قبل از انجام تیماربندی پست لاروها از نظر آلودگی به ویروس لکه سفید توسط کیت تشخیص ویروس Iq2000 (ژن ریچ، تایوان) بررسی شدند سپس به ۴ گروه تقسیم شدند. پست لاروها با تراکم ۲۰ قطعه در هرلیتر آب دریای فیلتر و استریل با شوری ۲۵ قسمت در هزار با هوادهی مناسب قرار گرفته و روزانه و به مدت ۵ روز با تراکم ۲۰ ناپلی به ازای هر پست لارو در روز مورد تغذیه قرار گرفتند (۳ وعده با ناپلی آرتمیا و ۳ وعده با پلیت تجاری ۴۰۰۱).

در گروه ۱ (۱۸۰ قطعه) پست لاروها با ناپلی های حاوی باکتری دارای پلاسمید نوترکیب (pMal-c2X+VP28) و گروه ۲ (۱۸۰ قطعه) با ناپلی های حاوی باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal-c2X) و گروه ۳ (۱۸۰ قطعه) با ناپلی حاوی باکتری بدون پلاسمید (TG1) و در گروه ۴ (۲۴۰ قطعه) پست لاروها با ناپلی آرتمیای طبیعی تغذیه شدند. در مدت نگهداری پست لاروها شوری، دما و pH آب آکواریوم‌ها اندازه گیری و ثبت گردید( شکل ۳-۵).




**شکل ۳-۵- تیماربندی اولیه پست لاروهای میگو**

**ب-۱-۱۳-آزمایش چالش**

**ب-۱-۱۳-۱- تعیین تیتر ویروس لکه سفید**

برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز یک چالش مطلوب با تقریباً ۷۵٪ تلفات، از همولنف لابستر آلوده به ویروس لکه سفید ($10^{5.4}$ $LD_{50}$/ml) رقت‌های مختلف ۱:۱۰ تهیه شد. پست لاروهای مرحله ۳۰ ( PL30) در رقت های متفاوت تهیه شده از همولنف آلوده به ویروس به مدت ۷ ساعت به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. پس از این مدت زمان میگوها از آب حاوی ویروس لکه سفید خارج شده و با آب شستشو شدند و در آکواریوم غیر آلوده جداگانه‌ای نگهداری شدند. دو بار در طول شبانه روز تلفات ثبت گردیده و میگوهای تلف شده به روش پاتولوژی مورد آزمایش قرار گرفتند. در آخر پایین‌ترین رقتی از همولنف آلوده به ویروس که سبب تلفات حداقل ۷۵ درصدی شده بود به عنوان میزان لازم در آزمایشات چالش مورد استفاده قرار گرفت.

### ب-۱-۱۳-۲- تیمار بندی آزمایش چالش

در پایان روز پنجم پس از تغذیه، پست لاروها طبق جدول ۳-۱۰ تیماربندی شده، در تیمارهای ۱ تا ۴ در آزمایش اول در روز هفتم آزمایش (۲ روز پس از اتمام تغذیه با آرتمیا) و در آزمایش دوم تیمار ها در روز ۳۰ آزمایش (۲۵ روز پس از اتمام تغذیه با آرتمیا) با ویروس لکه سفید به مدت ۷ ساعت مورد چالش قرار گرفتند، در تیمار ۵ پست لاروها با ویروس مواجه نشدند. علایم بالینی و تلفات در زمان های ۲۴،۱۲ ،۳۰، ۳۶، ۴۲، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۷۲، ۹۶و ۱۲۰ ساعت و تا ۲۵ روز پس از چالش بررسی و ثبت گردید.

**جدول۳-۱۰- تیماربندی پست لاروهای مورد آزمایش**

| ردیف | تیمار | آزمایش اول | آزمایش دوم |
|---|---|---|---|
| ۱ | ناپلی آرتمیای حاوی پلاسمید نوترکیب | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) |
| ۲ | ناپلی آرتمیای حاوی پلاسمیدغیر نوترکیب | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) |
| ۳ | ناپلی آرتمیای حاوی باکتری بدون پلاسمید | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) |
| ۴ | ناپلی آرتمیای طبیعی(کنترل مثبت) | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) | ۳۰پست لارو(۳ تکرار) |
| ۵ | ناپلی آرتمیای طبیعی(کنترل منفی) | ۳۰ پست لارو | ۳۰ پست لارو |

پس از اتمام تغذیه با آرتمیا میگوها براساس منابع موجود و براساس توده زنده با پلیت تجاری (سایزهای مختلف پلیت، شرکت هوواراش، بوشهر) با برنامه غذایی منظم تغذیه شدند. پس

از هر بار چالش میگوهای مورد آزمایش تا ۲۴ روز پس از آزمایش نگهداری شده و تلفات در این مدت ثبت گردید.

تلفات میگوها پس از ثبت به منظور تأیید آلودگی به ویروس لکه سفید در محلول تثبیت کننده دیویدسون نگهداری شده و در زمان مناسب از بافت‌ها اسلاید تهیه گردید.

**ب-۱-۱۴- روش آسیب شناسی**

**ب-۱-۱۴-۱- ثابت کردن**

میگوهای تلف شده با مقدار کافی محلول ثابت کننده دیویدسون ( به طور تقریبی حداقل حدود ۱۰ برابر از حجم محلول ثابت کننده برای هر نمونه) در ظروف جداگانه نگهداری شد. پس از مدت زمان ۴۸ ساعت، نمونه‌ها به الکل اتیلیک ۵۰٪ منتقل گردید(Lightner، ۱۹۹۶).

**ب-۱-۱۴-۲-آماده سازی بافت و قالب گیری**

میگوهای نگهداری شده از الکل اتیلیک ۵۰٪ خارج شده، بر روی سطح برش قرار گرفتند. با استفاده از اسکالپل برش‌های لازم بر روی میگوها اعمال شد و قطعات بافتی با ابعاد کمتر از ۸ میلی‌متر ضخامت تهیه شد (Lightner، ۱۹۹۶).

سپس قطعات بافتی میگوها به ترتیب در محلول‌های زیر قرار گرفته وآماده سازی شدند:

۱- الکل اتیلیک ۷۰٪ در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

۲- الکل اتیلیک ۸۰٪ در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

۳- الکل اتیلیک ۹۵٪ در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

۴- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

۵- گزیلول در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

۶- پارافین در ۲ ظرف جداگانه هرکدام ۱ ساعت

درپایان مرحله آماده سازی بافت های مورد نظر از سطح برش در کف قالب قرار گرفته و قالب با پارافین مخصوص قالب‌گیری پر شده، مشخصات هر قالب بر روی آن نوشته شد و تا زمان مقطع گیری در یخچال نگهداری می‌شد (Lightner، ۱۹۹۶).

**ب-۱-۱۴-۳- مقطع گیری**

توسط یک دستگاه میکروتوم دوار ( شاندون، آمریکا) قالب‌ها از سطح برش مورد نظر با ضخامت ۵ تا ۶ میکرون برش داده شد. برش‌ها ابتدا در یک ظرف حاوی الکل ۵۰٪ قرار گرفته، پس از باز شدن، برش به حمام آب منتقل شده سپس بر روی لام قرار گرفت.

**ب-۱-۱۴-۴- رنگ آمیزی**

ابتدا برش‌های پارافینی به منظور جداسازی پارافین از برش‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آب شدن پارافین، مقاطع آبگیری شده و به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و فلوکسین/ ائوزین به شرح زیر رنگ آمیزی شدند:

۱- گزیلول ۵ دقیقه

۲- گزیلول ۵ دقیقه

۳- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ ۱۰ مرتبه غوطه‌وری[1]

1. dips

| | |
|---|---|
| ۴- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۵- الکل اتیلیک ۹۵٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۶- الکل اتیلیک ۹۵٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۷- الکل اتیلیک ۸۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۸- الکل اتیلیک ۸۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۹- الکل اتیلیک ۵۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۰- آب مقطر | ۶ بار شستشو[1] |
| ۱۱- هماتوکسیلین | ۱۰ دقیقه |
| ۱۲- آب شیر(لوله کشی) | ۶ دقیقه |
| ۱۳- فلوکسین/ائوزین | ۲ دقیقه |
| ۱۴- الکل اتیلیک ۹۵٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۵- الکل اتیلیک ۹۵٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۶- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۷- الکل اتیلیک ۱۰۰٪ | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۸- گزیلول | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۱۹- گزیلول | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۲۰- گزیلول | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |
| ۲۱- گزیلول | ۱۰ مرتبه غوطه‌وری |

2. rinse

پس از طی شدن مراحل رنگ آمیزی رنگ‌های اضافه از روی لام پاک شده و توسط چسب انتلان یک لامل بر روی بافت رنگ شده چسبانده شد (Lightner، ۱۹۹۶).

**ب- ۱-۱۵- آنالیز آماری**

در پایان آزمایش چالش میزان بازماندگی نسبی از رابطه زیر محاسبه شده و توصیف آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ صورت گرفت. همچنین مقایسه تفاوت بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش با استفاده از نرم افزار IBM SPSS 19 صورت پذیرفت.

{۱۰۰× (تلفات گروه شاهد/ تلفات گروه های واکسیناسیون)-۱}

# فصل چهارم

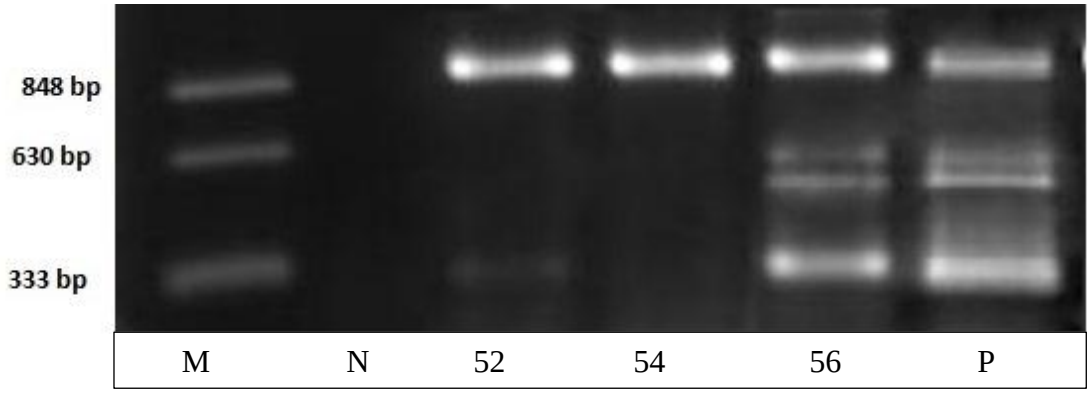
# نتایج

# فصل چهارم نتایج

## الف – تشخیص ویروس لکه سفید در بافت میگوی سفید غربی

پس از انجام نمونه برداری از مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان (استان خوزستان) تعداد ۱۰ نمونه با آزمایش کیت تشخیصی Iq2000 مثبت بودند. نمونه‌ای که بر اساس دستورالعمل کیت دارای حدت بالا[1] بود به عنوان جدایه ایرانی ویروس لکه سفید با نامIRI-KHZ/904 به عنوان الگو در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۴-۱).

1. Sever




**شکل ۴-۱- الکتروفورز محصول PCR کیت تشخیص مولکولی Iq2000**

**M: مارکر(۳۳۳ bp، ۶۳۰ bp، ۸۴۸ bp)، N: نمونه کنترل منفی، 52: نمونه مثبت خیلی خفیف، 54: نمونه میگوی منفی، 56: نمونه مثبت خیلی شدید،P: کنترل مثبت**

**ب- استخراج توالی ژن پروتئین VP28 ویروس لکه سفید از بانک ژن و طراحی پرایمر**

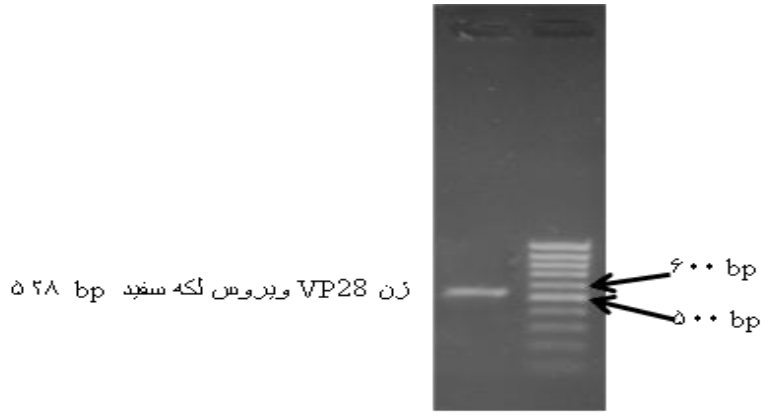
پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده پروتئین VP28 بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Jeroen Witteveldt در سال ۲۰۰۶، انتخاب گردیدند. با توجه به توالی ژن و نقشه وکتور pMal-c2X ،در انتهای'۵ این پرایمرها مکان برش آنزیم‌های محدودگر Sal I و Hind III نیز قرارداده شد تا امکان کلونینگ محصول PCR و بیان پروتئین VP28 فراهم گردد. توالی نوکلئوتیدی این پرایمرها در جدول ۴-۱ نشان داده شده است.

**جدول ۴-۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در پی‌سی‌آر**

| | |
|---|---|
| VP28 F 5' | GCC**GTCGAC**CACAACACTGTGACCA (**Sal I**) |
| VP28 R 5' | GCG**AAGCTT**ACTCGGTCTCAGTGCCAGA (**Hind III**) |

## ج – نتایج پی‌سی‌آر برای تکثیر ژن سازنده VP28

آزمایش پی‌سی‌آر با استفاده از پرایمرهای توصیف شده منجر به ساخت محصولی به اندازه ۵۲۸ جفت باز شد. محصول ژن تکثیر یافته در ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی رنگ سیف استین (شرکت سیناژن ایران)، در کنار یک نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی( شرکت فرمنتاس، لیتوانی) الکتروفورز شد و بوسیله نور ماوراء بنفش مشاهده گردید که با نتایج قابل انتظار همخوانی داشت(شکل ۴-۲).




**شکل ۴-۲- الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر ژن VP28 ویروس لکه سفید جدایه IRI-KHZ/904**

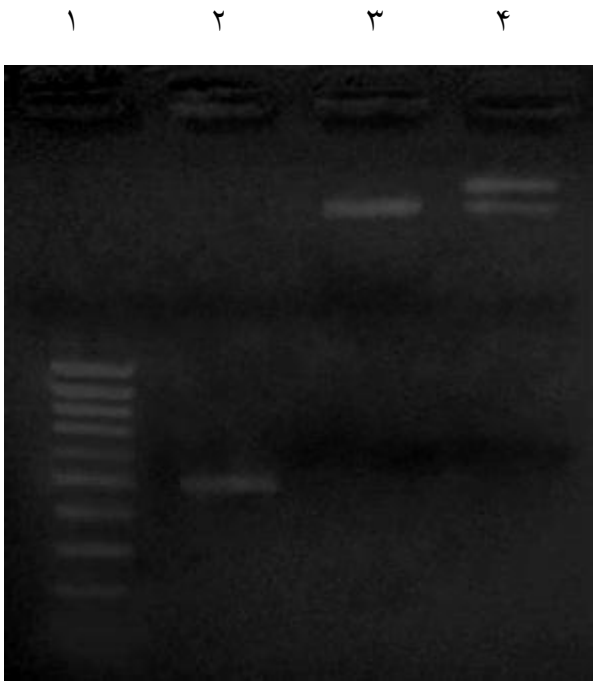
ستون سمت راست: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون سمت چپ: محصول پی‌سی‌آر ژن VP28

## د– تکثیر و خالص‌سازی وکتور

به منظور تکثیر و خالص‌سازی پلاسمید pMal-c2X، وکتور ابتدا از طریق ترانسفورماسیون به باکتری اشریشیا کلی سویه TG1 منتقل شد. سپس برای تأیید حضور وکتور در کلونی‌های بدست آمده، ابتدا به روش Miniprep استخراج پلاسمید صورت گرفت و پس از تأیید حضور وکتور، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت صورت گرفت و ۳ میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده بر روی ژل آگارز برده شد.

## هـ- هضم آنزیمی ژن و وکتور

پس از خالص‌سازی ژن VP28 و استخراج پلاسمیدpMal-c2X توسط کیت، ژن و وکتور توسط آنزیم های محدود کننده *Hind* III و *Sal* I به صورت جداگانه هضم شدند. برای تایید عمل هضم، مقداری از وکتور هضم شده بر روی ژل آگارز برده شد. پس از تأیید عمل هضم، ژن و وکتور توسط کیت خالص‌سازی شدند (شکل ۴-۳).

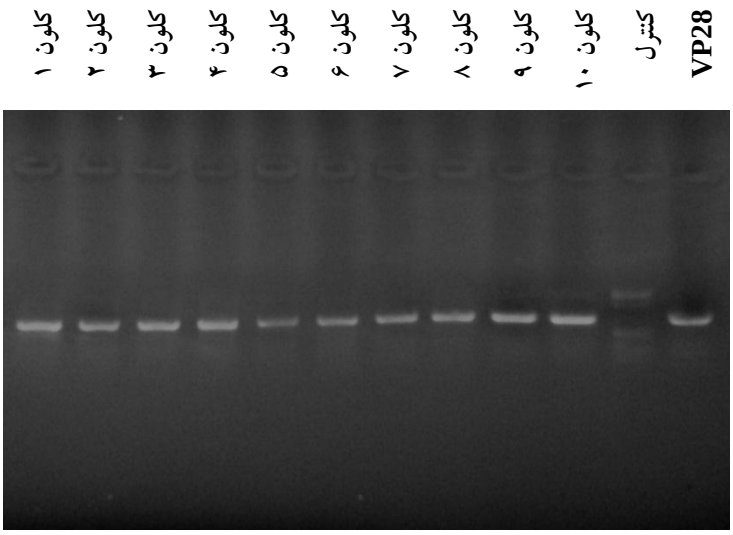



**شکل ۴-۳- پلاسمید pMal-c2X هضم و خالص شده و پلاسمید هضم نشده**
**ستون ۱: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: محصول پی‌سی‌آر ژن VP28، ستون ۳: پلاسمید خالص هضم شده، ستون ۴: پلاسمید خالص هضم نشده.**

## و - ورود ژن VP28 به داخل وکتور و تأیید صحت آن:

پس از هضم آنزیمی وکتور و محصول پی‌سی‌آر تکثیر یافته، ژن VP28 توسط عمل اتصال وارد وکتورpMal-c2X شد و پس از ترانسفورماسیون، کلونی‌های ایجاد شده بر روی LB

جامد آمپی‌سیلین‌دار، از لحاظ دارا بودن وکتور حاوی ژن به وسیله پی‌سی‌آر مورد بررسی قرار گرفتند( شکل ۴-۴).

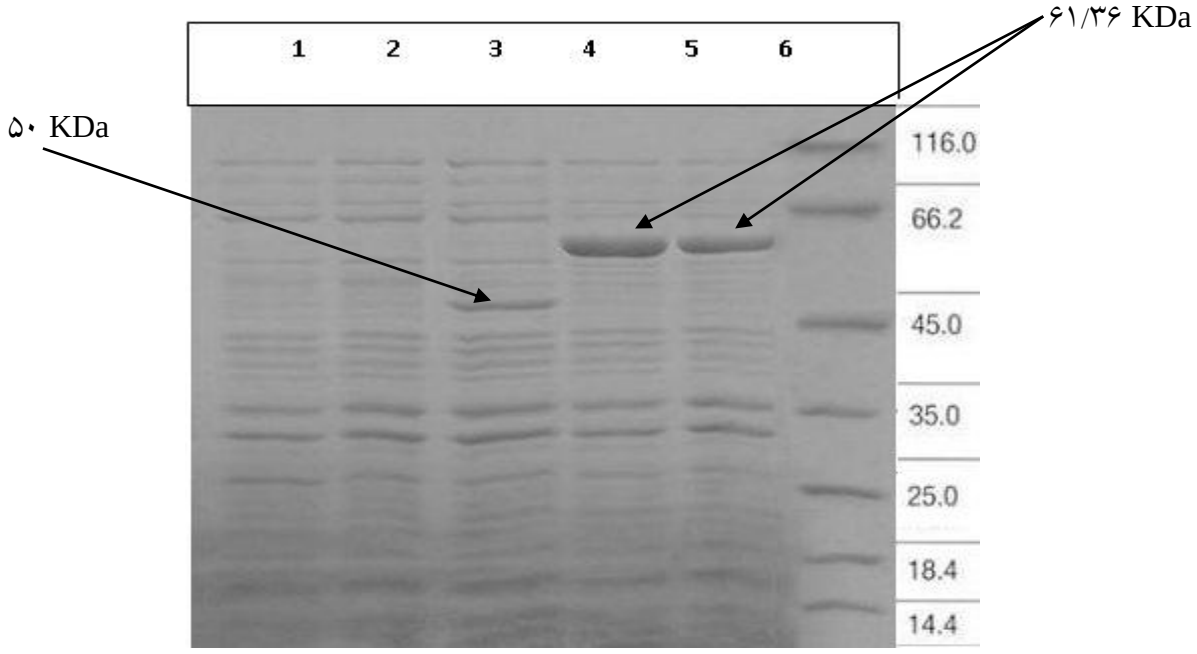



**شکل ۴-۴- الکتروفورز محصول پی سی آر بر روی پلاسمید های نوترکیب موجود در کلونی های باکتری TG1**

## ز- بررسی بیان پروتئین سازنده VP28

پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن سازنده VP28 در پلاسمید pMal-c2X، تعدادی از کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در یک لوله‌های آزمایش حاوی LB مایع آمپی‌سیلین‌دار بصورت شبانه کشت داده شدند. روز بعد این کشت‌های شبانه به نسبت ۱ درصد در یک کشت جدید وارد شدند و پس از گذشت ۳ ساعت و رسیدن به ($OD_{600}$ = 0.5 ) به آنها IPTG به نسبت ۰/۳ میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در حضور IPTG وجود پروتئین بیان شده در این باکتری‌ها با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. نتایج این بررسی بر روی دو عدد از کلونی‌های مورد آزمایش که مثبت تشخیص داده شد در شکل ۴-۵ نشان داده شده است.

همانگونه که در شکل مشخص شده است، با توجه به استاندارد پروتئینی مورد استفاده، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودنIPTG دارای پروتئینی با وزن مولکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی می‌باشد. پروتئین بیانی با احتساب وزن ۱۹/۳۶ کیلودالتون برای VP28 و ۴۲ کیلودالتون برای پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) که پلاسمید می‌سازد باید دارای وزنی حدود۶۱/۳۶ کیلودالتون باشد.



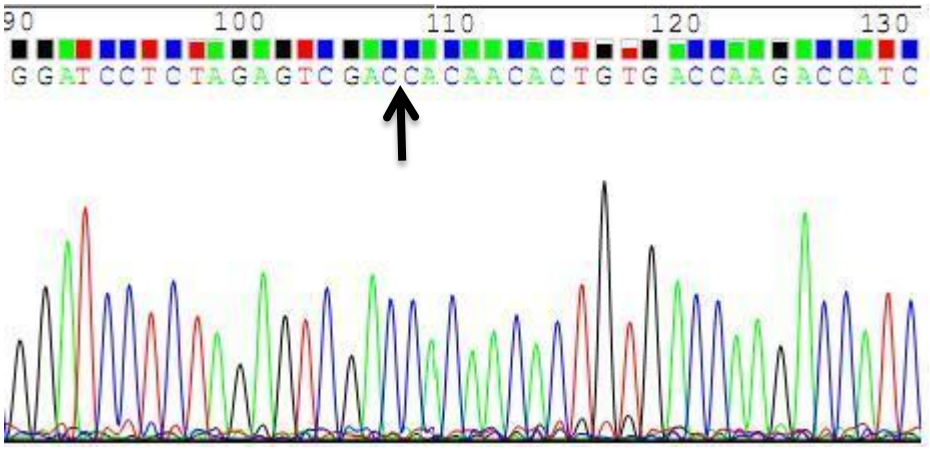

**شکل۴-۵- SDS - PAGE القای بیان پروتئینVP28 در باکتری اشریشیاکلی سویه‌یTG1**

**ستون۱: باکتری فاقد پلاسمید، ستون۲: باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب قبل از بیان، ستون ۳: باکتری حاوی پلاسمید غیر نوترکیب بعد از بیان، ستون ۴ و ۵: دو کلون مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از بیان، ستون ۶: مارکر پروتئین**

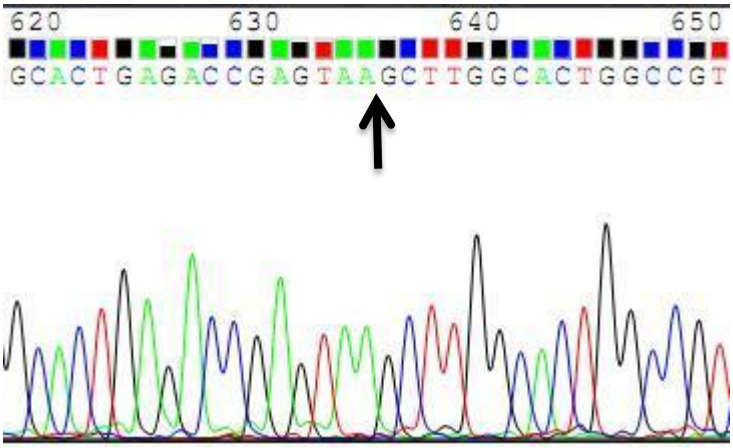
## ح- تعیین توالی ژن وارد شده به پلاسمید

سه کلونی که در آزمایش پی‌سی‌آر حاوی ژن بوده و در بررسی بیان نیز پروتئین بـا وزن مولکولی مورد انتظار را بیان نموده بودند، انتخاب شده و پلاسـمید آن‌هـا پـس از خـالص سـازی

تعیین توالی گردید که در بررسی تعیین توالی پلاسمید حاوی ژن هیچ گونه جهش و حذفی صورت نگرفته بود( شکل ۴-۶ و ۴-۷). توالی بدست آمده با عنوان توالی ژن VP28 یک جدایه ایرانی ویروس لکه سفید (IRI-KHZ/904 ) و با شماره دسترسی AB855742 در بانک ژن ثبت گردید(شکل ۴-۸).




**شکل ۴-۶- کروماتوگرام ابتدای ژن VP28 ، محل برش آنزیم *Sal* I و اتصال به پلاسمید**



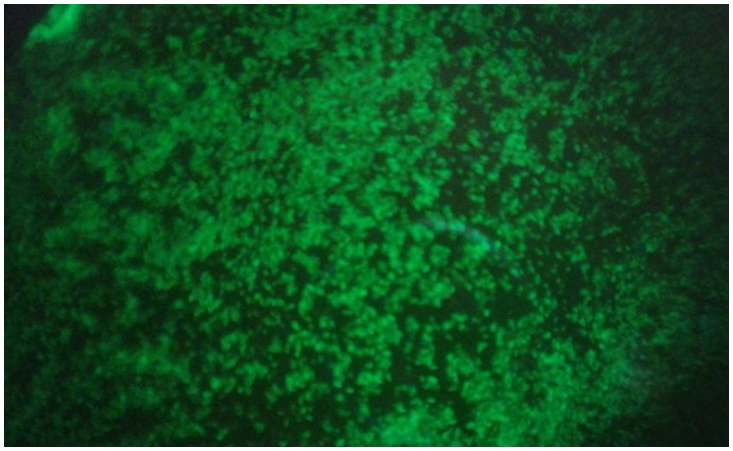

**شکل ۴-۷- کروماتوگرام انتهای توالی ژن VP28 ، محل برش آنزیم *Hind* III و اتصال به پلاسمید**

```
  1  CAC AAC ACT GTG ACC AAG ACC ATC GAA ACC CAC ACA GAC AAT ATC GAG ACA AAC ATG GAT   60
 61  GAA AAC CTC CGC ATT CCT GTG ACT GCT GAG GTT GGA TCA GGC TAC TTC AAG ATG ACT GAT   120
121  GTG TCC TTT GAC AGC GAC ACC TTG GGC AAA ATC AAG ATC CGC AAT GGA AAG TCT GAT GCA   180
181  CAG ATG AAG GAA GAA GAT GCG GAT CTT GTC ATC ACT CCC GTG GAG GGC CGA GCA CTC GAA   240
241  GTG ACT GTG GGG CAG AAT CTC ACC TTT GAG GGA ACA TTC AAG GTG TGG AAC AAC ACA TCA   300
301  AGA AAG ATC AAC ATC ACT GGT ATG CAG ATG GTG CCA AAG ATT AAC CCA TCA AAG GCC TTT   360
361  GTC GGT AGC TCC AAC ACC TCC TCC TTC ACC CCC GTC TCT ATT GAT GAG GAT GAA GTT GGC   420
421  ACC TTT GTG TGT GGT ACC ACC TTT GGC GCA CCA ATT GCA GCT ACC GCC GGT GGA AAT CTT   480
481 TTC GAC ATG TAC GTG CAC GTC ACC TAC TCT GGC ACT GAG ACC GAG TAA  528
```

**شکل ۴-۸-توالی نوکلئوتیدی ژن سازنده پروتئین VP28 ویروس لکه سفید جدایه ایرانی ثبت شده در بانک ژن با شماره دسترسیAB855742**

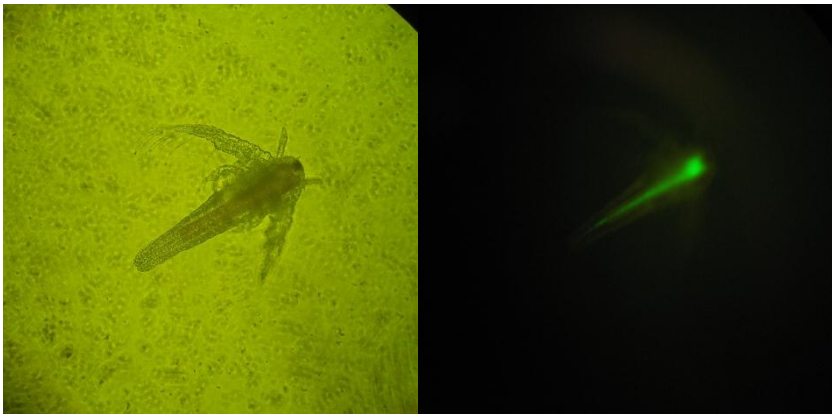
## ط- بررسی تولید ناپلی آرتمیای حاوی پلاسمید بیان کننده *GFP*

پس از تولید باکتری TG1 بیان کننده پروتئین GFP (تصویر ۴-۹) و خوراندن باکتری‌های غیرفعال شده با فرمالین به ناپلی‌های آرتمیا و شستشوی ناپلی‌ها مشخص شد که در زمان ۹۰ دقیقه دستگاه گوارش ناپلی‌ها از باکتری پرشده بود و این زمان برای تولید ناپلی‌های نوترکیب در نظر گرفته شد ( شکل ۴-۱۰).



**شکل ۴-۹- باکتری TG1پس از بیان پروتئین GFP**

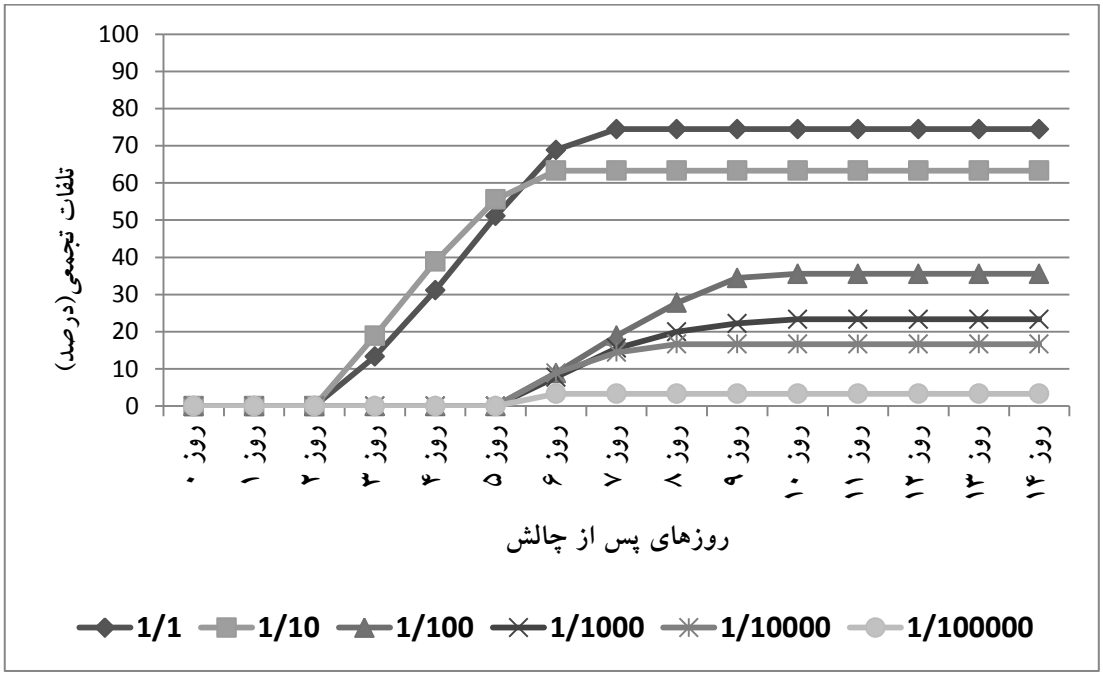
**(بزرگنمایی:۴۰۰ X)**



**شکل ۴-۱۰- ناپلی آرتمیا ۹۰ دقیقه پس از تغذیه با باکتری حاوی GFP**
**شکل سمت چپ:عکس با میکروسکوپ نوری، شکل سمت راست: عکس با میکروسکوپ فلورسنت ( بزرگنمایی: X۱۰۰)**

## ی-تعیین تیتر ویروس مورد نیاز برای چالش

برای تعیین میزان ویروس مورد نیاز یک چالش مطلوب با تقریباً ۷۵٪ تلفات،از همولنف لابستر آلوده به ویروس لکه سفید ($10^{5.4}$ $LD_{50}$/ml) رقت‌های مختلف ۱/۱۰ تهیه شد. پست لاروهای ۳۰ ( PL30) در رقت های متفاوت تهیه شده از همولنف آلوده به ویروس به مدت ۷ ساعت به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. پست لاروها به مدت ۱۴ روز نگهداری شده و تلفات ثبت گردید. پس از این مدت مشخص گردید که رقت ۱/۱ ( همولنف رقیق نشده) با تلفات ۷۵ درصدی بایستی در آزمایش چالش مورد استفاده قرار گیرد (نمودار ۴-۱).

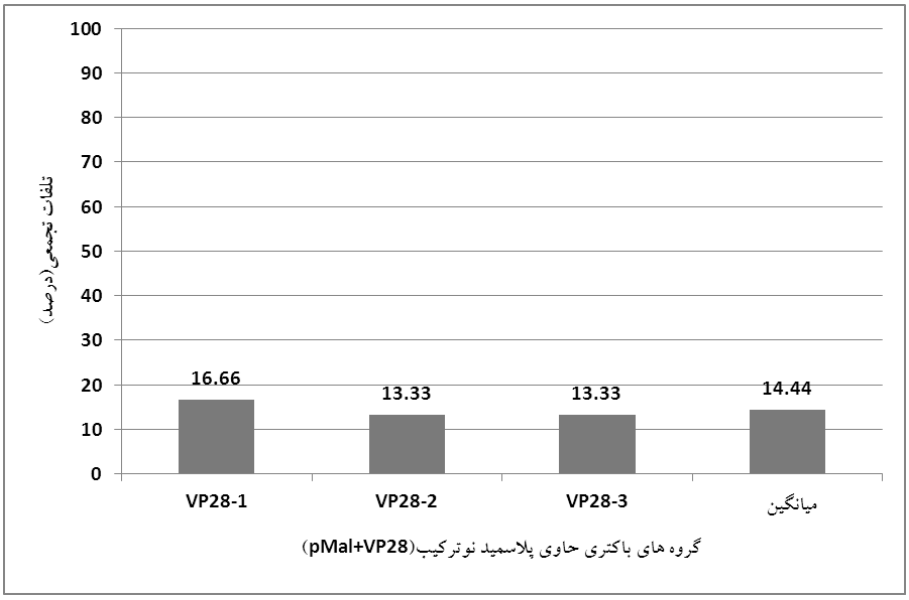



**نمودار ۴-۱- مقایسه تلفات تجمعی رقت‌های متفاوت ویروس**

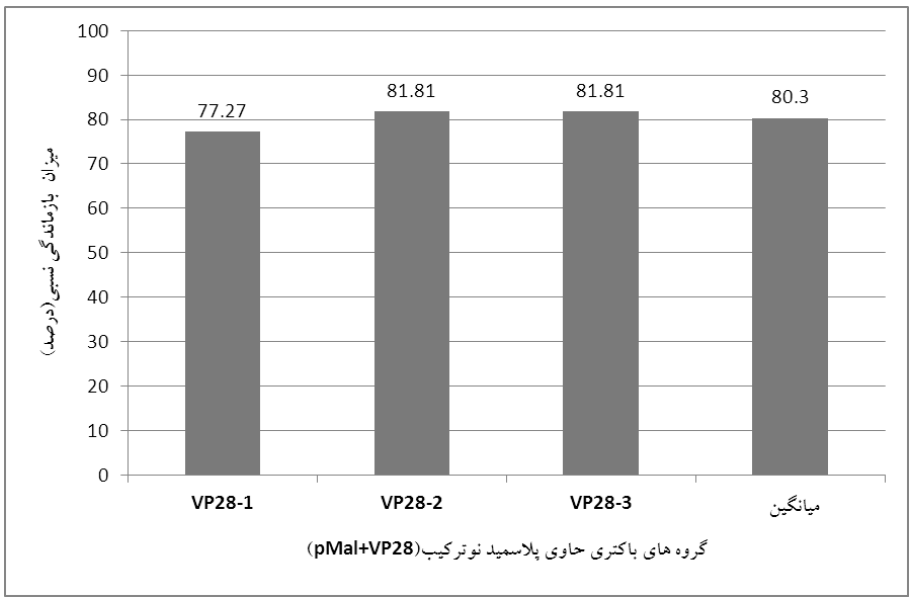
## ک- بررسی ایمن سازی میگوهای سفید غربی

درپایان روز پنجم پس از تغذیه پست لاروها با ناپلی آرتمیای نوترکیب پست لاروها به ۴ تیمار تقسیم شده و ۲ روز پس از اتمام تغذیه با آرتمیای نوترکیب به میزان ۱ میلی‌لیتر در ۱ لیتر آب از دوز مناسب ویروس برای مدت ۷ ساعت غوطه ور شده سپس به آکواریوم‌های تمیز منتقل شدند. تلفات در گروه‌ها از روز سوم پس از چالش در گروه کنترل و روز چهارم در سه گروه دیگر آغاز و به مدت ۳ تا ۵ روز در تکرارهای مختلف ادامه یافت. میگوها تا ۱۴ روز پس از چالش نگهداری شده و تلفات ثبت گردید. در پایان روز ۱۴ پس از چالش مشخص گردید که

میانگین درصد تلفات در گروه حاوی پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) برابر ۱/۱۱± ۱۴/۴۴٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۱/۵۱ ± ۸۰/۳۰٪ بود. در این گروه در تکرارهای مختلف درصد تلفات از ۱۳/۳۳ تا ۱۶/۶۶ و میزان بازماندگی نسبی از ۷۷/۲۷ تا ۸۱/۸۱ درصد متغیر بود (نمودار ۴-۲ و ۴-۳).

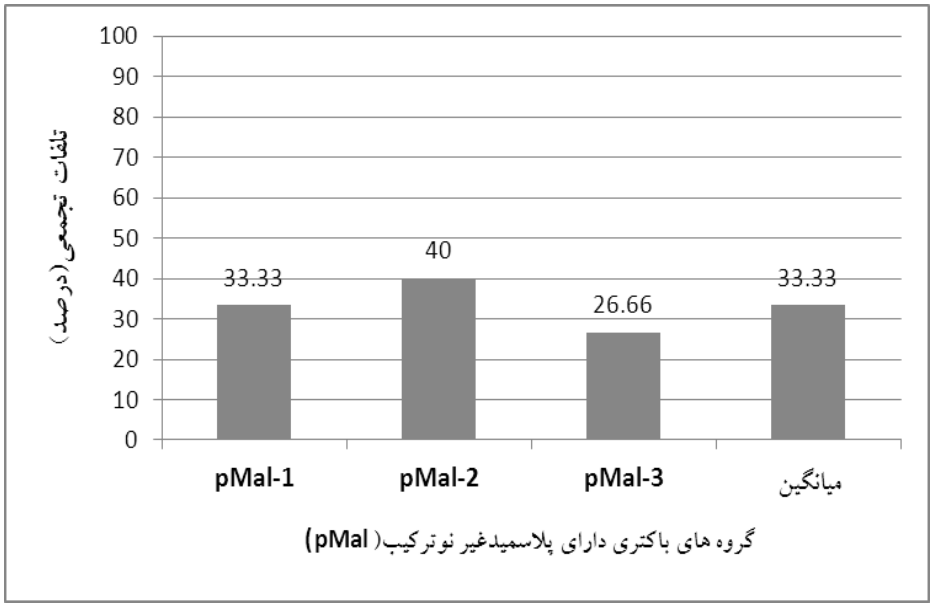



**نمودار ۴-۲- مقایسه میزان تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب**

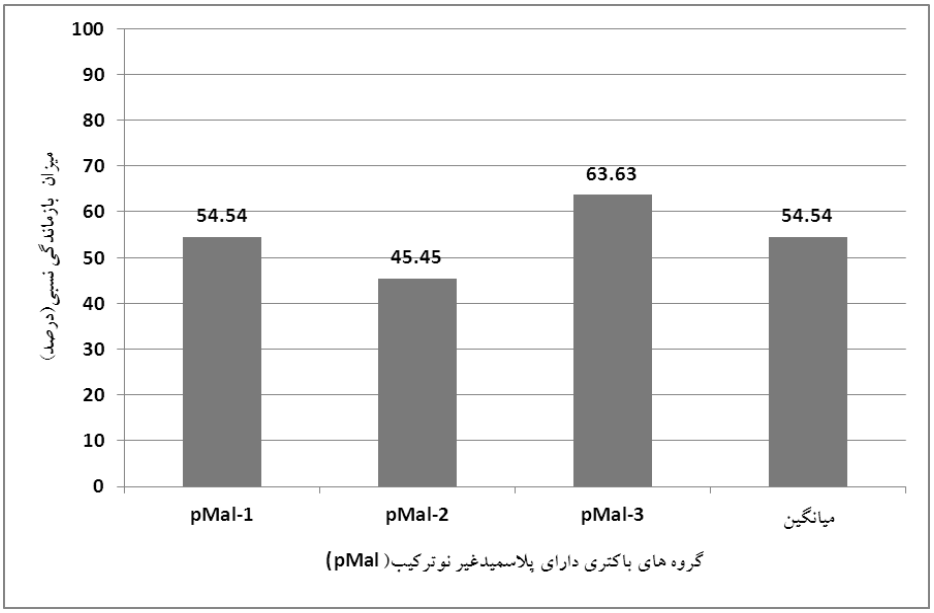



**نمودار ۴-۳- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب**

در گروه باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal) میانگین درصد تلفات ۳/۸۴ ± ۳۳/۳۳٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۵/۲۴ ± ۵۴/۵۴٪ بود. در بررسی تکرار های این گروه درصد تلفات از ۲۶/۶۶٪ تا ۴۰٪ و درصد بازماندگی نسبی از ۴۵/۴۵٪ تا ۶۳/۶۳٪ متغیر بود(نمودار۴-۴ و ۴-۵)




**نمودار ۴-۴- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب**



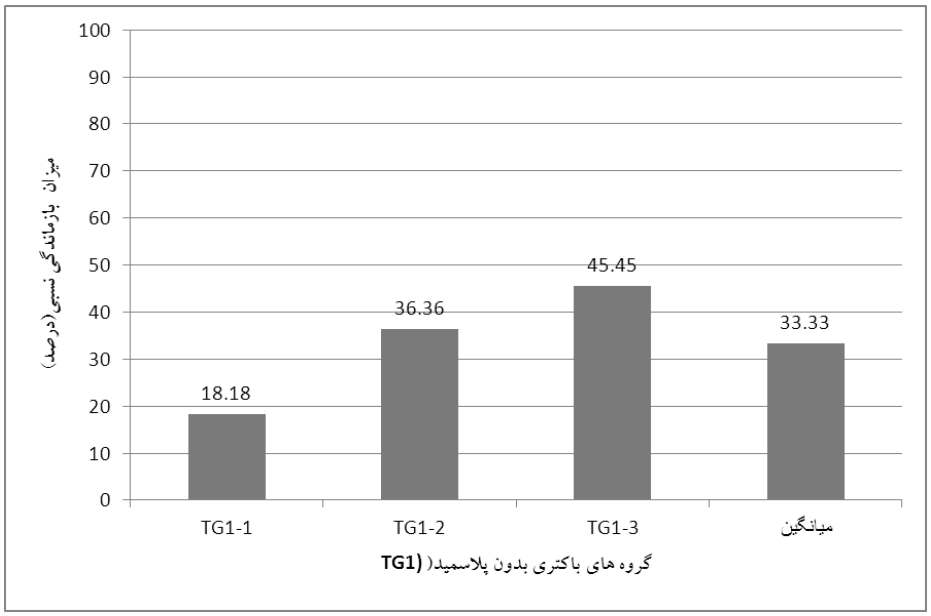

**نمودار ۴-۵- مقایسه بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب**

در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) میانگین درصد تلفات۵/۸۷± ۴۸/۸۸٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۸/۰۱ ± ۳۳/۳۳٪ بود. در بررسی تکرار های این گروه درصد

تلفات از ۴۰٪ تا ۶۰٪ و درصد بازماندگی نسبی از ۱۸/۸۰٪ تا ۴۵/۴۵٪ متغیر بود ( نمودار ۴-۶ و ۴-۷)

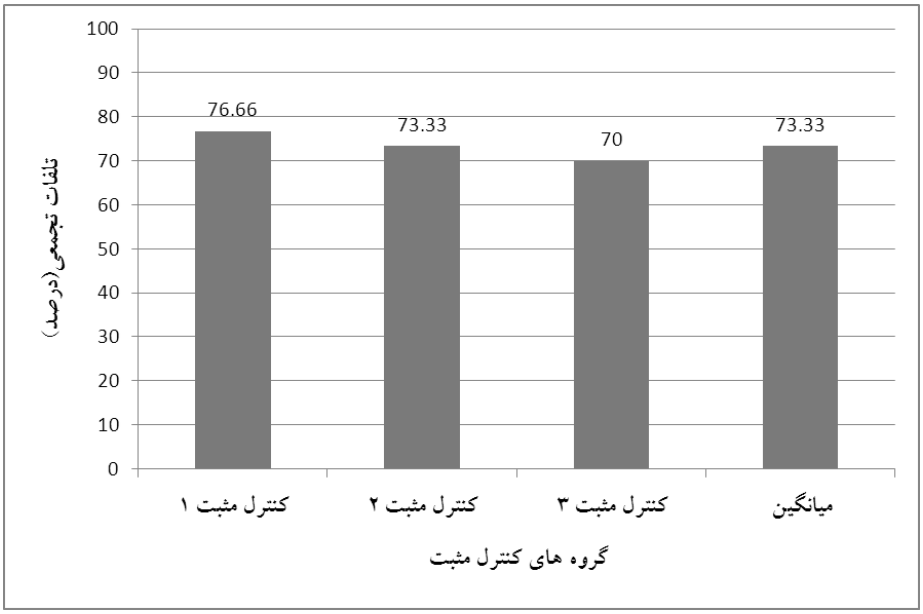



**نمودار ۴-۶- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید**



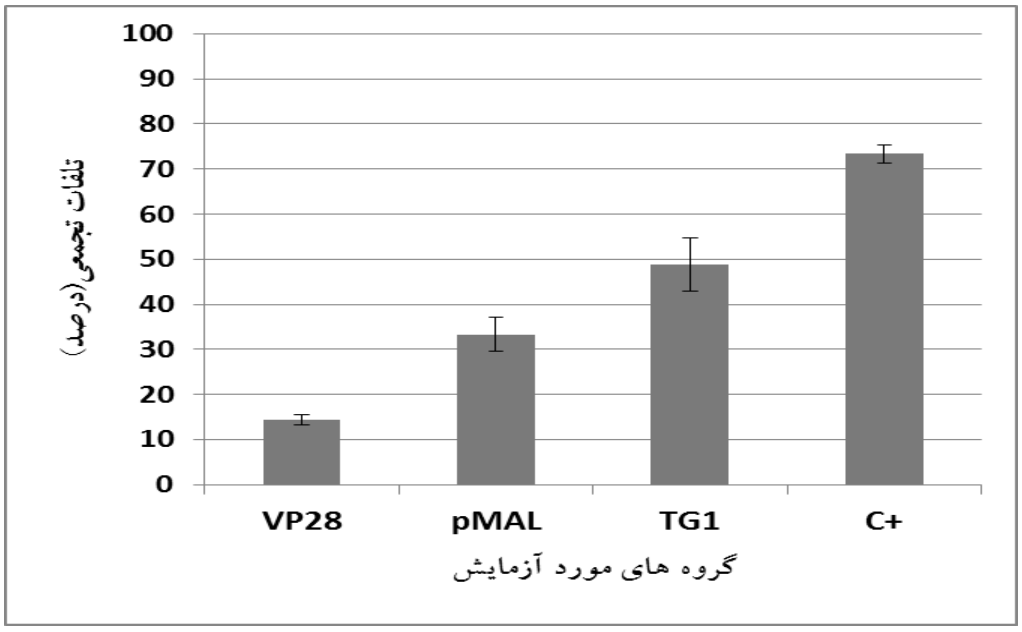

**نمودار ۴-۷- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید**

در گروه کنترل مثبت در چالش اول (+C) میانگین درصد تلفات ۱/۹۲± ۷۳/۳۳٪ بود. در بررسی تکرار های این گروه درصد تلفات از ۷۰٪ تا ۷۶/۶۶٪ متغیر بود (نمودار ۴-۸).

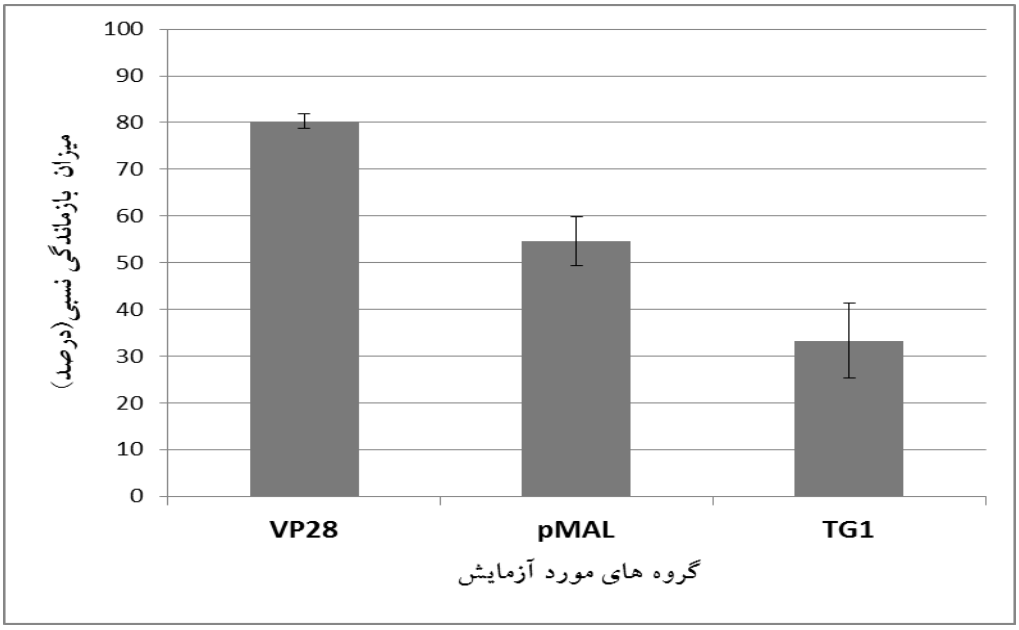



**نمودار ۴-۸- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های کنترل مثبت در چالش اول**

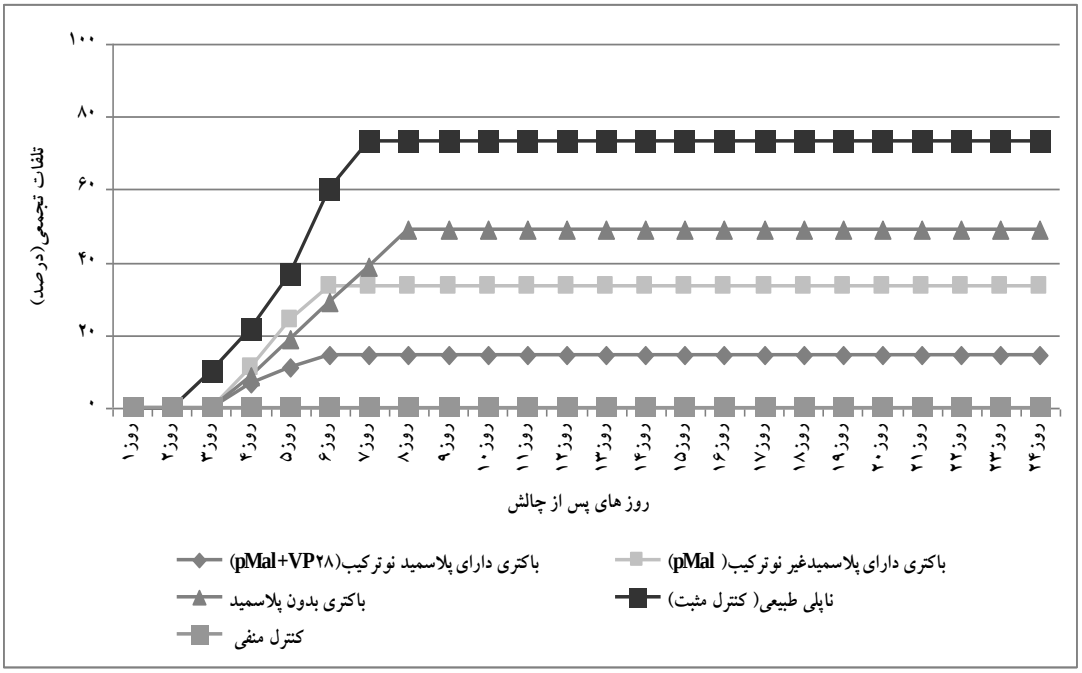
همچنین در بررسی‌های آماری بین گروه‌های مورد آزمایش از نظر درصد تلفات و میزان بازماندگی نسبی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$) ( نمودار ۴-۹ ، ۴-۱۰ و ۴-۱۱).



نمودار ۴-۹- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در چالش اول



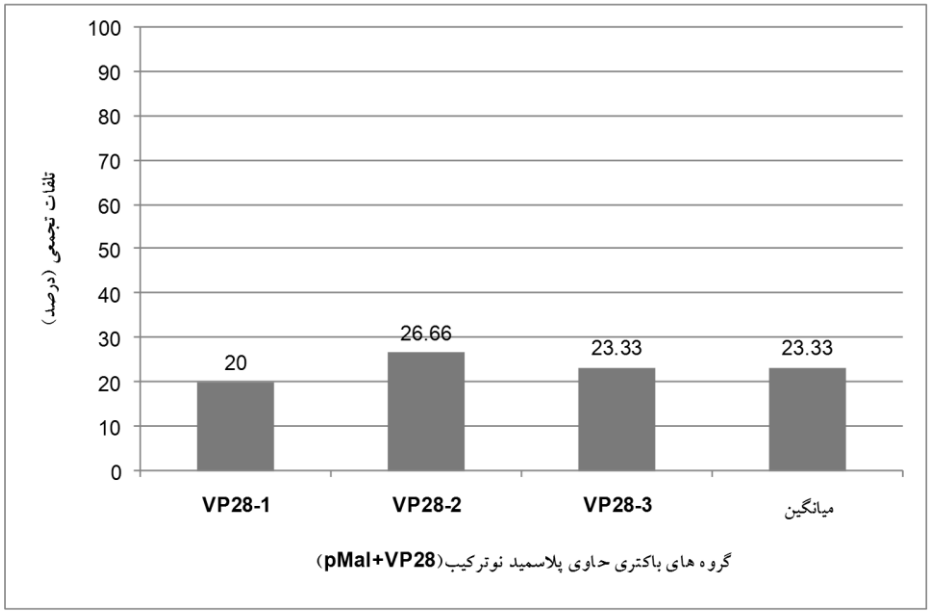

نمودار ۴-۱۰- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در چالش اول



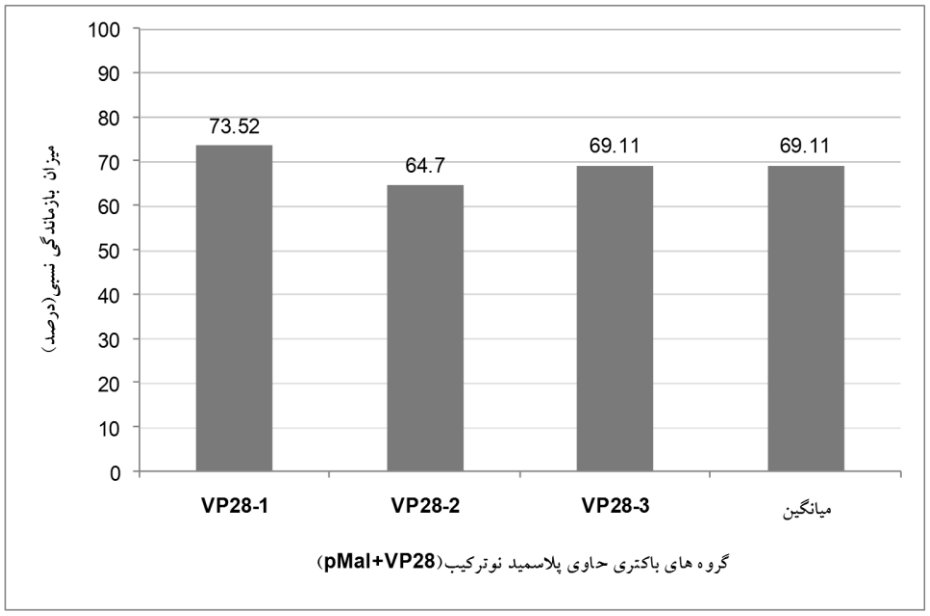

نمودار ۴-۱۱- مقایسه تلفات تجمعی در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش اول

در آزمایش دوم نیمی از میگوهای باقیمانده گروه ها در روز ۳۰ آزمایش (۲۴ روز پس از اتمام تغذیه با آرتمیا) با ویروس لکه سفید (به روشی که ذکر شد) مورد چالش قرار گرفتند، در گروه کنترل منفی نیز همانند آزمایش اول میگوها با ویروس مواجه نشدند.

پس از گذشت ۵ روز از آزمایش چالش در گروه حاوی پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) تلفات شروع و تا روز ۸ پس از چالش ادامه یافت. در این گروه میانگین تلفات ۱/۹۲±۲۳/۳۳٪ و میانگین میزان بازماندگی نسبی ۲/۵۴ ± ۶۹/۱۱٪ بود (نمودار ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

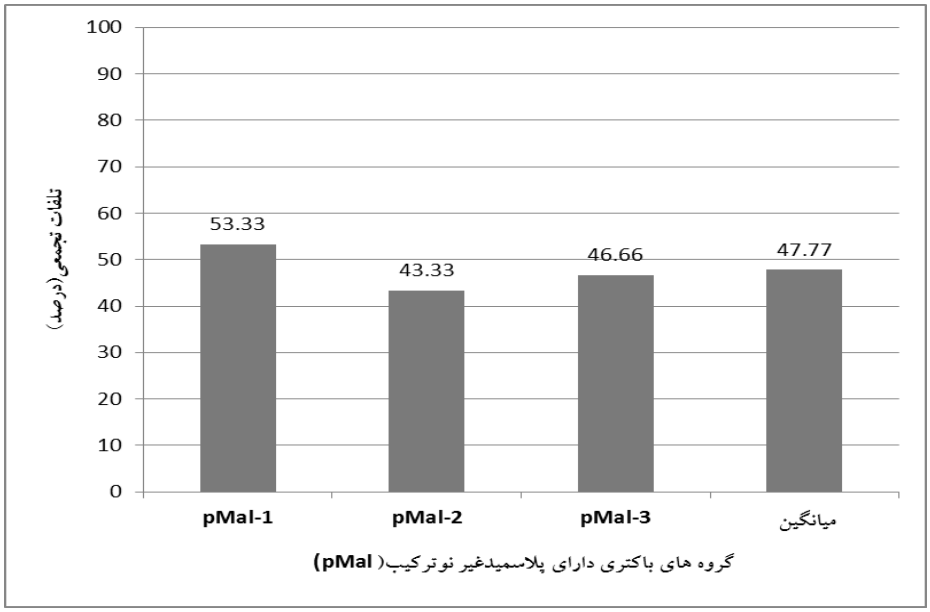



**نمودار ۴-۱۲- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در آزمایش چالش دوم**

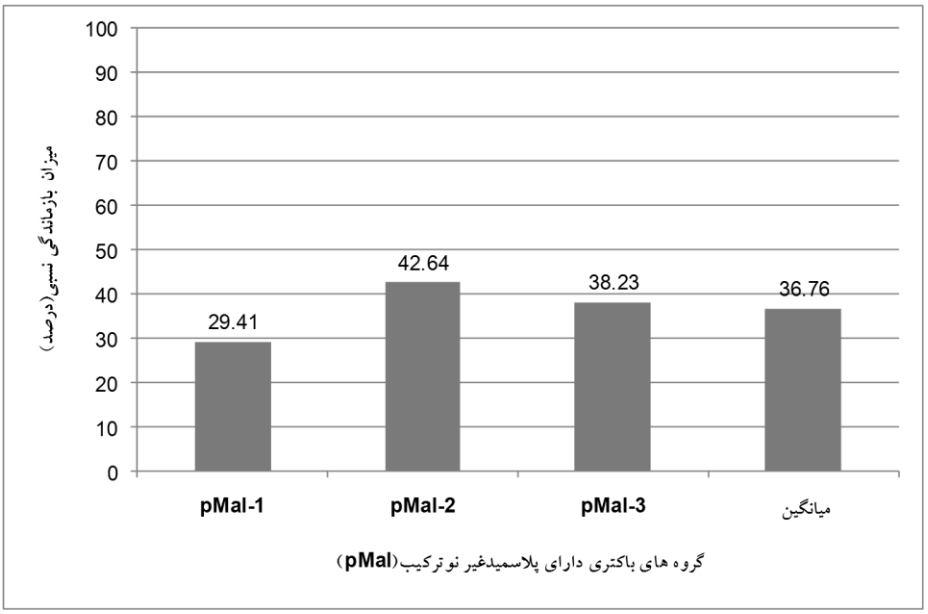



**نمودار ۴-۱۳- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در آزمایش چالش دوم**

در گروه باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal) میانگین درصد تلفات ۲/۹۳ ± ۴۷/۷۷٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۳/۸۹ ± ۳۶/۷۶٪ بود. در بررسی تکرار های این گروه درصد تلفات از ۴۳/۳۳٪ تا ۵۳/۳۳٪ و درصد بازماندگی نسبی از ۲۹/۴۱٪ تا ۴۲/۶۴٪ متغیر بود ( نمودار ۴-۱۴ و ۴-۱۵)

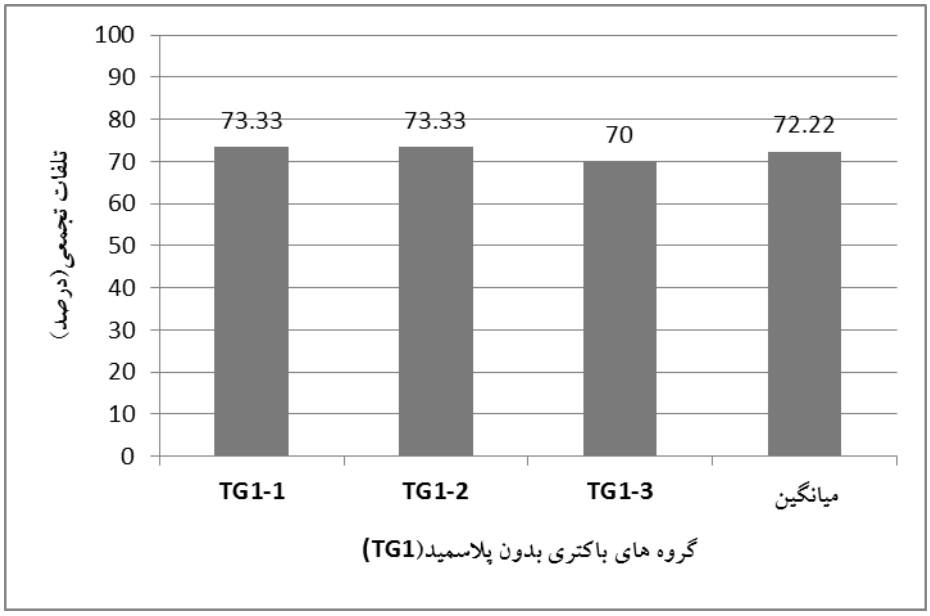



**نمودار ۴-۱۴- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیرنوترکیب در آزمایش چالش دوم**

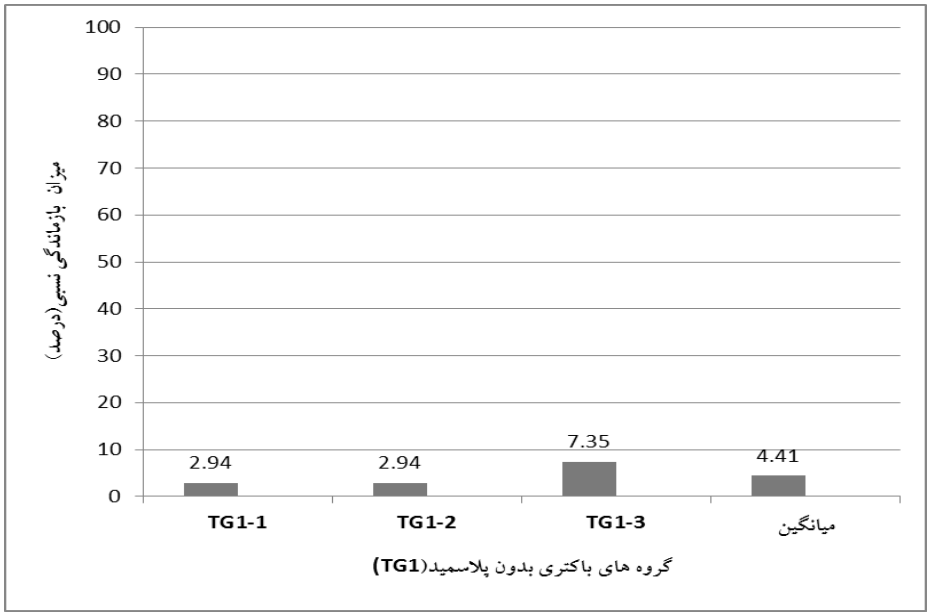



**نمودار ۴-۱۵- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری حاوی پلاسمید غیر نوترکیب در آزمایش چالش دوم**

در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) میانگین درصد تلفات ۱/۱۱ ± ۷۲/۲۲٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۱/۴۷ ± ۴/۴۱٪ بود. در بررسی تکرارهای این گروه درصد تلفات از ۷۰٪ تا ۷۳/۳۳٪ و درصد بازماندگی نسبی از ۲/۹۴٪ تا ۷/۳۵٪ متغیر بود ( نمودار ۴- ۱۶ و ۴- ۱۷).

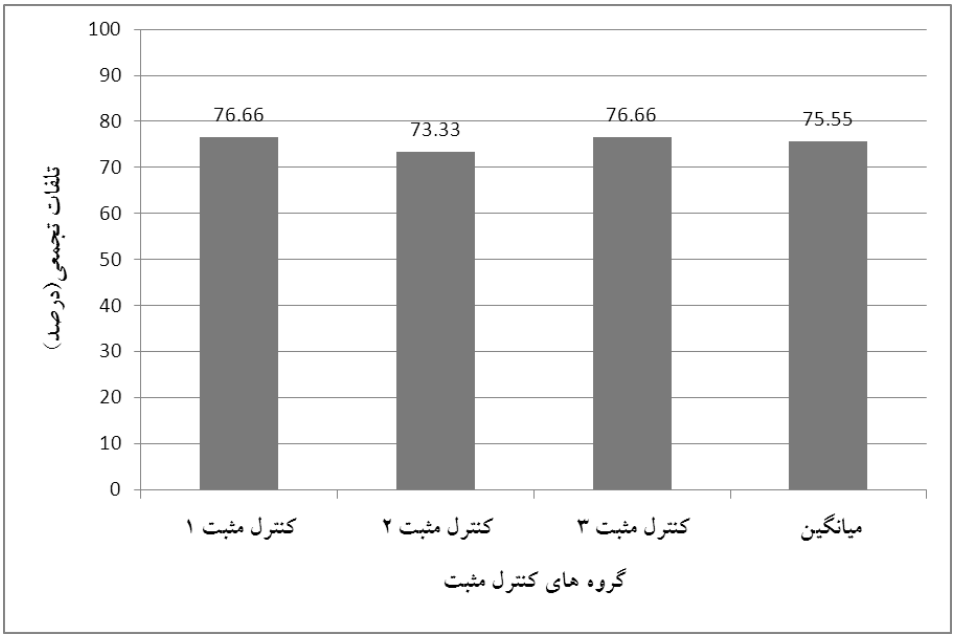



**نمودار۴-۱۶- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید در آزمایش چالش دوم**



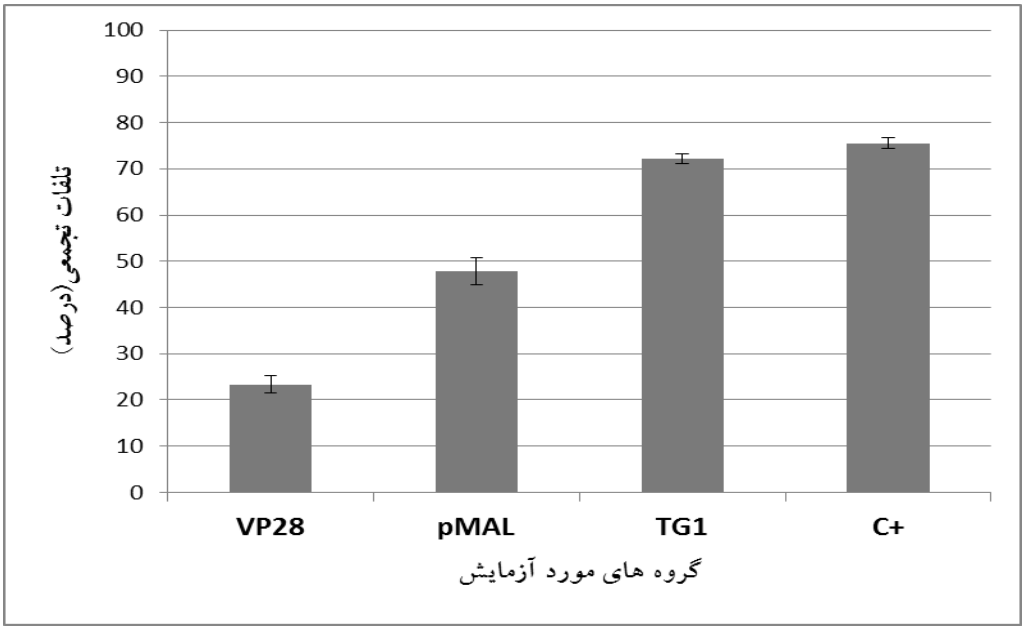

**نمودار۴-۱۷- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مختلف دریافت کننده باکتری بدون پلاسمید در آزمایش چالش دوم**

در گروه کنترل مثبت در چالش دوم (C+) میانگین درصد تلفات ۱/۱۱ ± ۷۵/۵۵٪ بود. در بررسی تکرارهای این گروه درصد تلفات از ۷۳/۳۳٪ تا ۷۶/۶۶٪ متغیر بود (نمودار ۴-۱۸).

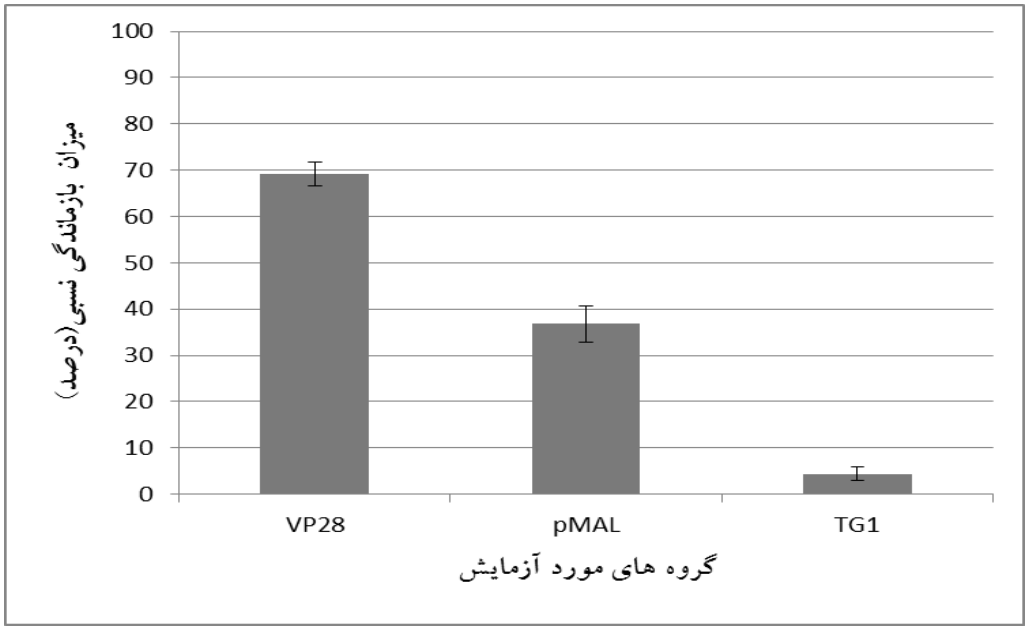



**نمودار۴-۱۸- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های کنترل مثبت چالش دوم**

همچنین در بررسی‌های آماری بین گروه‌های مورد آزمایش در چالش دوم نیز از نظر درصد تلفات و میزان بازماندگی نسبی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$)(نمودار ۴- ۱۹، ۴-۲۰ و ۴-۲۱).




**نمودار ۴-۱۹- مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های مورد آزمایش در چالش دوم**



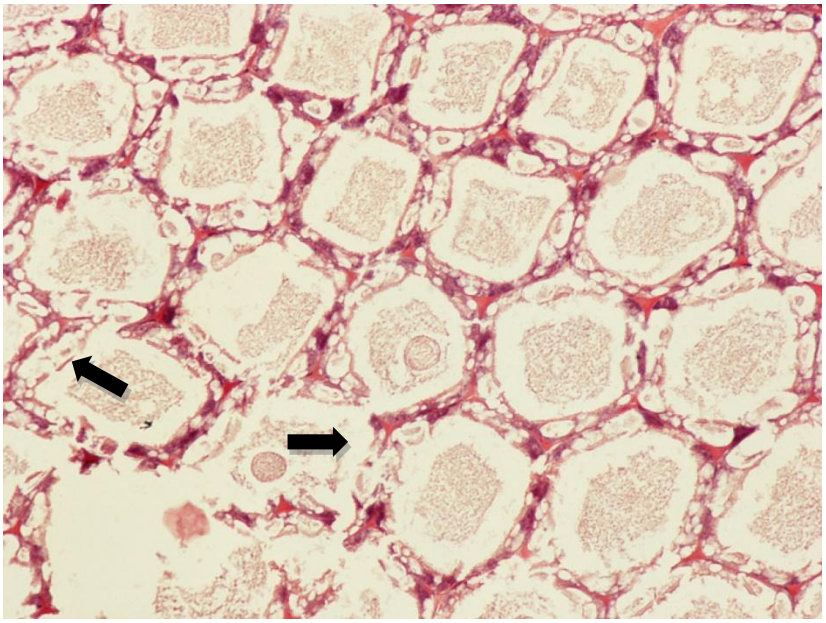

**نمودار ۴-۲۰- مقایسه درصد بازماندگی نسبی گروه‌های مورد آزمایش در چالش دوم**



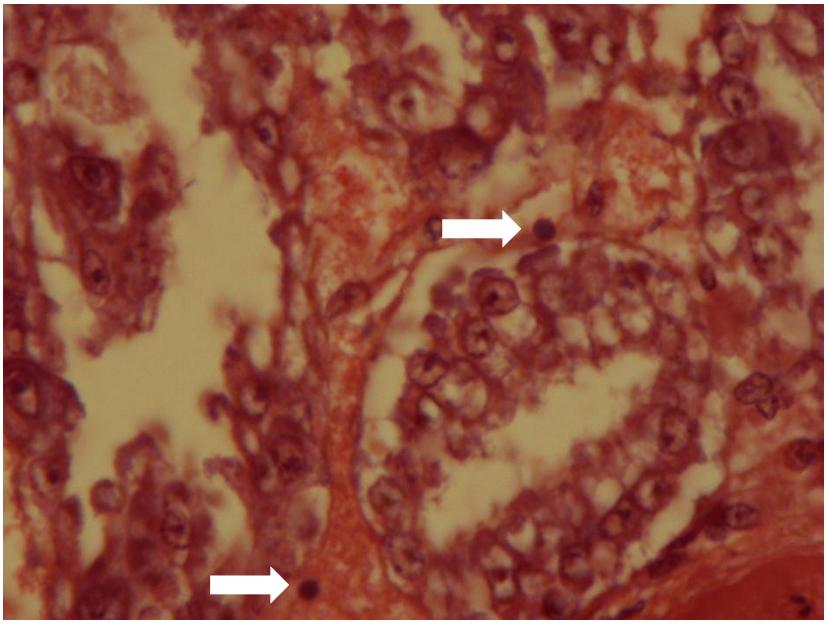

**نمودار ۴- ۲۱- مقایسه تلفات تجمعی گروه‌های مختلف مورد آزمایش در چالش دوم**

## ل- بررسی هیستوپاتولوژی آزمایش چالش

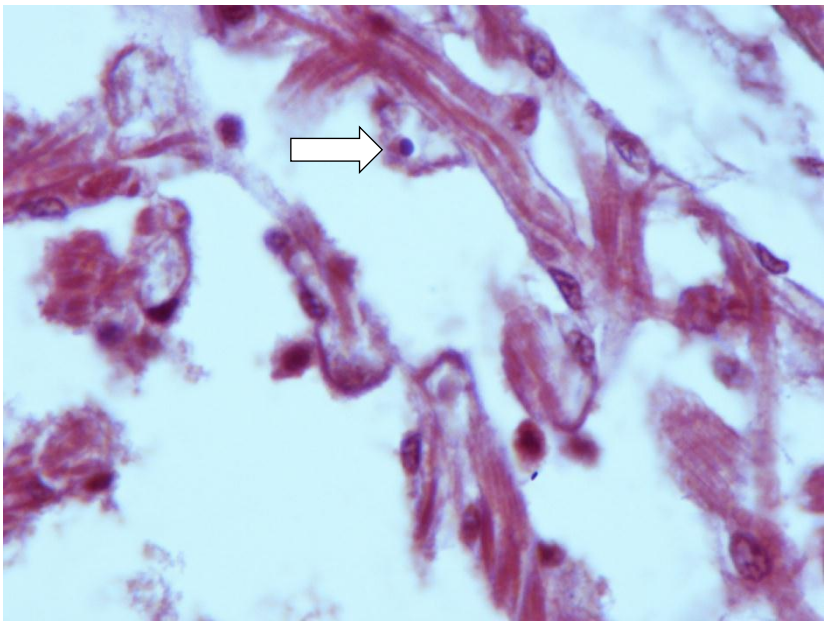
پس از نمونه برداری بافتی، برش و رنگ‌آمیزی مقاطع، ضایعات اختصاصی ویروس در اندام‌های مختلف از جمله هپاتوپانکراس، آبشش، معده، قلب و عضلات میگوها مشاهده گردید ( شکل ۴- ۱۱، ۴- ۱۲، ۴-۱۳، ۴-۱۴ و ۴-۱۵).



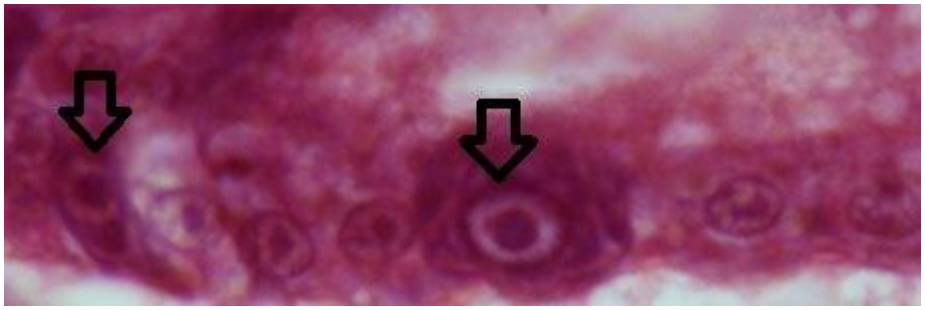
**شکل ۴-۱۱- واکوئله شدن سلول های هپاتوپانکراس در میگوهای گروه چالش (هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین) ( بزرگنمایی X۴۰۰)**



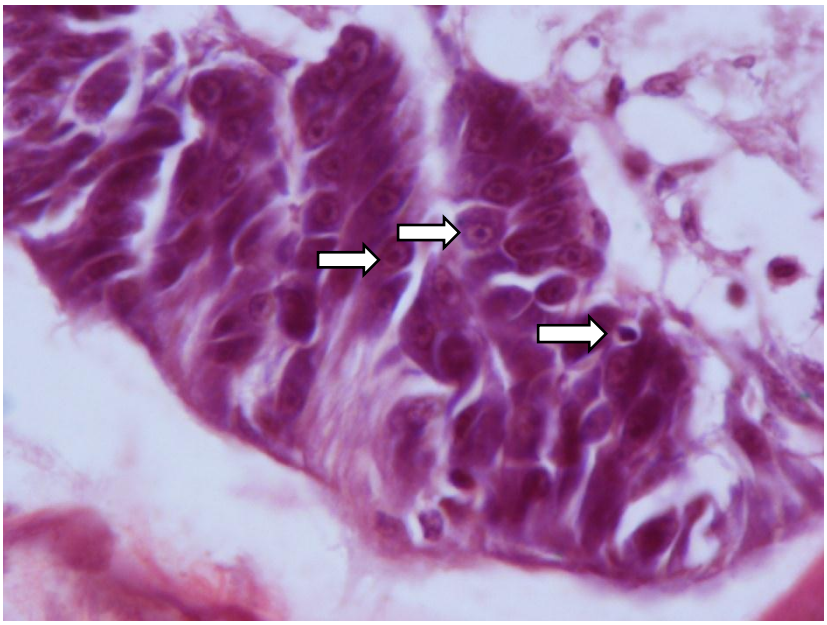
شکل ۴-۱۲ - بروز گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس میگوهای تلف شده
(رنگ‌آمیزی:هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین، بزرگنمایی X۱۰۰۰)



شکل ۴-۱۳- وجود گنجیدگی در بافت عضله قلب میگوی تلفاتی پس از چالش
(رنگ‌آمیزی:هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین، بزرگنمایی X۱۰۰۰)



**شکل ۴-۱۴- گنجیدگی در بافت همبند هپاتوپانکراس میگوی چالش شده با ویروس لکه سفید (رنگ‌آمیزی:هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین، بزرگنمایی X۱۰۰۰)**



**شکل ۴-۱۵- اپی تلیوم معده،** پیکان‌ها گنجیدگی‌ها را نشان می‌دهند **(رنگ‌آمیزی:هماتوکسیلین، ائوزین/فلوکسین، بزرگنمایی X۱۰۰۰)**

# فصل پنجم

# بحث و نتیجه گیری

# فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری

آبزی‌پروری دارای بیشترین پتانسیل برای پاسخ‌گویی به تقاضای رو به رشد غذاهای آبزیان است. سخت پوستان یکی از اجزای با ارزش در آبزی پروری را شامل می‌شوند که در بین آن‌ها پرورش میگو از اهمیت بسزایی برخوردار است. تولید میگو برای قرن‌ها در بسیاری از کشورها موفق و پایدار مانده است. از این‌رو در این کشورها پرورش میگو به یک بخش مهم از صادرات به منظور کسب درآمد و ارزآوری تبدیل شده و این موفقیت، بسیاری از کشورهای دیگر را تشویق به ورود به پرورش صنعتی میگو برای صادرات نمود. (Bardhan، ۲۰۰۶؛ FAO، ۲۰۰۶).

اگر چه پرورش میگوی جهان با افزایش سهم از ۶٪ در سال ۱۹۷۰ میلادی به ۶۹٪ در سال ۲۰۰۴ رسید و به یک صنعت توسعه یافته تبدیل شد( FAO، ۲۰۰۶؛ Rosenberry، ۲۰۰۲) و میزان تولید میگوی سفید غربی از ۴۷۵۳۶۳ تن (۲/۳ میلیارد دلار) در سال ۲۰۰۰ به ۲۷۲۰۹۲۹ تن (۱۱/۳ میلیارد دلار) در سال ۲۰۱۰ رسید، اما پرورش میگو در سطح وسیع همراه با مدیریت

ضعیف به سرعت منجر به آلودگی شدید در استخرهای میگو شده، در نتیجه محیط مناسبی برای گسترش بیماری‌های باکتریایی و ویروسی فراهم گردید.

بروز بیماری‌های میگو بالاخص بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش میگو در جهان می‌باشد. بیماری ویروسی لکه سفید یکی از مهلک‌ترین این بیماری‌ها است که موجب تلفات سنگینی در کلیه میگوهای خانواده پنائیده می‌شود. در ایران طی سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۳ در استان خوزستان و سال ۱۳۸۴ در استان بوشهر اغلب استخرها و مزارع آلوده به بیماری لکه سفید شده و کل صنعت پروش میگو با خطر تعطیلی مواجه و در حدود ۱۰ میلیارد تومان خسارت به پرورش دهندگان وارد گردید ( افشارنسب و همکاران ،۱۳۸۵ ؛ آمار نامه شیلات ایران ۱۳۸۴ )

به‌علت ضربه مهم بیماری لکه سفید به پرورش میگو، نیاز ضروری برای توسعه راهبردهای مناسب در جهت محافظت میگوهای پرورشی و پایدار کردن پرورش میگو احساس می‌شود. در این تحقیق امکان محافظت میگو در مقابل ویروس لکه سفید مورد بررسی قرار گرفته و موفقیت نسبی قابل توجهی به دست آمد.

چندین رهیافت برای بهبود سیستم ایمنی و توسعه مقاومت میگوها در برابر بیماری وجود دارد که عبارتند از:

- استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی از قبیل بتا ۱و۳ گلوکان، پپتیدوگلیکان و لیپوپلی‌ساکاریدها.

- استفاده از پروبیوتیک‌ها برای اصلاح و تقویت سلامت عمومی میگوها.

– استفاده از پست‌لاروهای عاری از ویروس برای ذخیره‌سازی، مدیریت کیفیت آب و جلوگیری از ناقلین ویروس ودیگر راهکارهای بهداشتی( Chang و همکاران، ۱۹۹۹؛ Devaraja و همکاران، ۱۹۹۸؛ Itami و همکاران، ۱۹۸۹؛ Song و همکاران، ۱۹۹۷ و Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰).

با این حال هیچ یک از روش‌های فوق به تنهایی یا تواماً موفقیت کامل را در محافظت میگو در برابر بیماری لکه سفید نداشته‌اند.

واکسیناسیون به طور گسترده‌ای به عنوان یک روش برای محافظت انسان‌ها و حیوانات در برابر عوامل عفونی مورد قبول واقع شده است. این راهکار در بیشتر حیوانات و انسان برای محافظت در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی و ویروسی موفقیت‌آمیز بوده است (Kimbrell و Beutler، ۲۰۰۱).

تحقیق حاضر نشان داد که ایمن سازی می‌تواند میگوها را در برابر چالش محافظت کند و احتمالاً این موضوع به دلیل تقویت ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بوده است.

از اواخر سال ۲۰۰۷ شواهدی به دست آمد که فرضیه دارا بودن نوعی سیستم ایمنی اکتسابی در بی‌مهرگان را تقویت می‌کرد. در خصوص سخت پوستان از جمله میگو ، عموماً اعتقاد بر این بوده است که این موجودات دارای ایمنی اکتسابی نیستند و در نتیجه راهکار واکسیناسیون نمی تواند برای کنترل بیماری‌های این حیوانات مؤثر باشد. اخیراً محققین نشان داده‌اند که با استفاده از پروتئین‌های غشایی ویروس بیماری لکه سفید می‌توان پاسخ ایمنی و محافظت خوبی را در برابر این بیماری در میگوها ایجاد نمود (Dehghan وهمکاران، ۲۰۱۱). واکسیناسیون مؤثر

میگوهای ببری سیاه و ژاپنی با استفاده از ویبریوی غیرفعال شده نیز توسط برخی از محققین گزارش شده است (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴).

ایمنی ضد ویروس لکه سفید، حضور فعالیت خنثی سازی ویروس در پلاسمای میگوهای آلوده به ویروس از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت را نشان داده است. این نتایج سبب شده است که محققین به فرضیه القاء پاسخ ضد ویروس و واکسیناسیون بر علیه آن توجه بیشتری داشته باشند (Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۴).

سیستم ایمنی ذاتی میگو شامل ایمنی سلولی و خونی به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. اجزاء ایمنی سلولی عبارتند از هموسیت‌ها که در کپسوله کردن، بیگانه‌خواری، ملانیزه کردن، سمیت (کشندگی) سلولی، ارتباطات سلول به سلول، ایجاد لخته و فعالیت سیستم پروفنل اکسیداز دخالت دارند (Soderhall، ۱۹۹۹). مجموعه‌ای از عوامل خونی شامل آنزیم‌های دفاعی، لکتین‌ها، میانجی‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و تعدادی از پپتیدهای ضدمیکروبی شناسایی شده‌اند (Destoumieux و همکاران، ۲۰۰۰؛ Kimbrell و Beutler، ۲۰۰۱؛ Lee و Soderhall، ۲۰۰۲ و Soderhall، ۱۹۹۹).

چندین مطالعه، تنظیم ایمنی سلولی و خونی میگوها را در پاسخ به تجویز دیواره سلول‌های باکتری و مخمر و یا کل باکترین نشان داده‌اند که راهبردی شبیه واکسیناسیون در حیوانات عالی‌تر محسوب می‌شود (Alabi و همکاران، ۱۹۹۹؛ Devaraja و همکاران، ۱۹۹۸؛ Itami و همکاران، ۱۹۸۹؛ Kou و همکاران، ۱۹۸۹؛ Song و Hsieh، ۱۹۹۴ و Teunissen، ۱۹۹۸).

Keith و همکاران (۱۹۹۲)، گزارش دادند که خرچنگ دریایی آمریکا با باکتری غیرفعال

شده *آئروکوکوس ویریدانس* واریته هوماری[1] واکسینه شد و ۶ روز پس از واکسیناسیون مقاومت در برابر باکتری مشاهده گردید و این مقاومت تا ۹۳ روز ادامه داشت.

در مطالعه‌ی دیگری در میگوی ژاپنی نشان داده شد که پلاسمای میگوهای زنده مانده از بیماری لکه سفید قادر به خنثی کردن ویروس از ۲۰ روز تا ۲ ماه پس از عفونت می‌باشند (Wu و همکاران، ۲۰۰۲).

Kurtz و Franz (۲۰۰۳)، نشان دادند که کوپه پود *ماکروسیکلوپس آلبیدوس*[2] پاسخ ایمنی کارآمدتری را پس از برخورد قبلی با یک انگل که از لحاظ آنتی‌ژنی مشابه بود داشت.

به طور مشابه، مطالعات هرچند محدود، فعال شدن سیستم ایمنی بدن، شامل پاسخ‌های سلولی و خونی را در عفونت‌های تجربی با ویروس لکه سفید نشان داده‌اند. آزمایشات تجربی با میگوی ژاپنی حضور یک پاسخ شبه ایمنی را در میگوهای بازمانده از بیماری لکه سفید به صورت طبیعی یا تجربی که مجدداً با ویروس لکه سفید مورد چالش قرار گرفتند نشان داد که درصد بازماندگی در مقایسه با میگوهای سالم و غیر بیمار بسیار بالاتر بود (Pan و همکاران، ۲۰۰۰؛ Rojtinnakorn و همکاران، ۲۰۰۲؛ Roux و همکاران، ۲۰۰۲ و Venegas و همکاران، ۲۰۰۰).

این مشاهدات احتمال حضور پاسخ ایمنی خاطره‌ای را در میگوها نشان دادند تا مرزهای جدیدی از تحقیقات به سمت استفاده از واکسن‌ها برای محافظت در برابر بیماری لکه سفید گشوده شود. این راهبرد در صورت موفقیت، فرصت بزرگی را برای مقابله با ویروس لکه سفید فراهم کرده و صنعت پرورش میگو را پایدار خواهد نمود.

1 . *Aerococcus viridans* var. *homari*

2. *Macrocyclops albidus*

بیش از ۵۰ پروتئین ساختاری و یک پروتئین غیر ساختاری VP9 در ویروس لکه سفید شناسایی شده است (Liu Y. و همکاران، ۲۰۰۶). این پروتئین‌ها را براساس وزن تخمینی آن‌ها در آزمایشات SDS-PAGE یا بر اساس تعداد اسید آمینه پروتئین‌ها نامگذاری کرده‌اند.

در آزمایشات خنثی سازی مشخص شد که پروتئین‌های غشاء (VP24، VP28، VP31، VP36B، VP68، VP76، VP281 و VP466) در مراحل اولیه تکثیر ویروس لکه سفید نقش دارند (Huang و همکاران، ۲۰۰۵؛ He و همکاران، ۲۰۰۵؛ Li, L.J. و همکاران، ۲۰۰۶؛ Li, L. و همکاران، ۲۰۰۵؛ van Hulten و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵؛ Xie و Yang ، ۲۰۰۶).

پروتئین VP28 در اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها (Yi و همکاران،۲۰۰۴) و عفونت عمومی دخالت دارد ( van Hulten و همکاران،۲۰۰۱b؛ Wu و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان داده است که پرایمرهای طراحی شده برای ژن VP28 و آنتی بادی تولیدی بر علیه این پروتئین در تشخیص جدایه‌های متفاوت این ویروس مناسب بوده است (Musthaq و همکاران، ۲۰۰۶؛ Poulos و همکاران، ۲۰۰۱).

VP28 با وزن مولکولی تقریبی ۲۲ کیلودالتون فراوان‌ترین پروتئین ساختاری موجود در غشاء می‌باشد ( Tang، وهمکاران، ۲۰۰۷) که هیچ گونه شباهتی را به سایر پروتئین‌های شناخته شده به جز با برخی از پروتئین‌های ساختاری ویروس لکه سفید نشان نمی‌دهد (Robalino، وهمکاران، ۲۰۰۶).

به نظر می‌رسد این پروتئین موجب اتصال ویروس به سلول‌های میگو شده و نقش مهمی را نیز در نفوذ ویروس به درون سلول میزبان ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد این پروتئین می‌توانند ویروس را خنثی کرده و عفونت ویروسی

را مهار نمایند (Yi، وهمکاران، ۲۰۰۴). بر این اساس پروتئین VP28 و ژن کد کننده آن به منظور تشخیص و کنترل بیماری لکه سفید مورد توجه قرارگرفته اند (Mavichak، و همکاران، ۲۰۱۱).

تجزیه و تحلیل رونویسی از ژن VP28 در مطالعات بیان ژن نشان داده است که این پروتئین محصول یک ژن بیانی تأخیری است و ایمنی‌زا می‌باشد و واکسیناسیون با این پروتئین سبب محافظت میگوها در برابر بیماری لکه سفید می‌گردد (Witteveldt و همکاران، a و b ۲۰۰۴). همه این مشاهدات توان بالقوه VP28 به عنوان یک کاندید مهم در واکسیناسیون بر علیه ویروس لکه سفید در میگو را تقویت می‌کند.

با این پیش زمینه، مطالعه حاضر به منظور بررسی پتانسیل‌های ایمنی‌زایی پروتئین VP28 غشاء ویروس لکه سفید انجام شده و اثر بخشی آن به عنوان یک راه محافظت میگوی سفید غربی در برابر بیماری لکه سفید مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه ژنوم ویروس لکه سفید از میگوهای بیمار جداسازی گردید. آزمایش پی‌سی‌آر با استفاده از پرایمرهای ( ژن VP28 ) طراحی شده برای این پژوهش منجر به ساخت محصولی با اندازه ۵۲۸ جفت باز شد. پس از خالص‌سازی ژن VP28 و پلاسمید pMal-c2X ، هر دو توسط آنزیم‌های محدود کننده *Hind* III و *Sal* I به صورت جداگانه هضم شدند. پس از هضم آنزیمی پلاسمید و محصول پی‌سی‌آر تکثیر یافته، ژن VP28 وارد پلاسمید pMal-c2X شد و ورود آن به داخل پلاسمید با انجام آزمایش پی‌سی‌آر و تعیین توالی تأیید شد.

پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن VP28 جدایه IRI-KHZ/904 و مقایسه آن با توالی مربوطه در جدایه‌های بسیاری از کشورهای مختلف جهان مشخص گردید که جدایه ایرانی دارای

همسانی ۱۰۰ درصد با ۱۰ جدایه از جدیدترین توالی‌های ثبت شده در بانک ژن بود. بین توالی جدایه ایرانی با ۴ جدایه دیگر ثبت شده در بانک ژن نیز ۹۹ درصد همسانی وجود داشت.

توالی‌های مورد مقایسه در این مطالعه متعلق به جدایه‌هایی از کشورهای آسیایی و نیز جدایه‌هایی از قاره آمریکا بودند. شباهت بسیار بالای ژن VP28 در میان این جدایه‌ها نشان می‌دهد که احتمال وقوع موتاسیون در این قسمت از ژنوم ویروس بسیار پایین می‌باشد. میزان بالای حفاظت ژن VP28 در جدایه‌های مختلف این ویروس توسط Kasornchandra وهمکاران (۱۹۹۸) نیز مورد تأیید قرار گرفته است.

براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه و سایر تحقیقات در این زمینه به نظر می‌رسد ژن VP28 ویروس لکه سفید به دلیل میزان حفاظت بسیار بالا کاندید مناسبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژی نمی‌باشد اما در مقابل می‌توان از این ژن و پروتئین حاصل از آن برای توسعه روش‌های تشخیص بیماری لکه سفید بر پایه پی‌سی‌آر یا آنتی‌بادی و نیز تولید واکسن‌های نوترکیب به منظور تحریک سیستم ایمنی میگوها استفاده نمود.

پروتئین نوترکیب VP28 تا کنون در سیستم‌های بیانی مختلفی از قبیل باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* (*E.Coli*)، باکتری گرم مثبت، سلول‌های حشرات، مخمر و کرم ابریشم بیان شده است (Caipang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Du و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۷؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶a؛ Jha و همکاران، ۲۰۰۶b؛ Mavichak وهمکاران، ۲۰۰۹؛ Namikoshi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Witteveldt و همکاران،۲۰۰۴a,b؛ Witteveldt و همکاران، ۲۰۰۶؛ Xu و همکاران، ۲۰۰۶).

در این پژوهش پروتئین نوترکیب VP28 در سیستم بیانی پروکاریوتی pMal-c2X و باکتری *اشریشیا کلی* سویه TG1 بیان گردید. پس از غیرفعال نمودن باکتری از ناپلی آرتمیا به عنوان یک وکتور برای انتقال باکتری حاوی پروتئین به پست لاروهای میگو استفاده شد.

Chin و همکاران (۲۰۰۷)، از ناپلی آرتمیا به عنوان وکتور برای واکسن خوراکی ویروس نکروز عصبی[1] در لاروهای ماهی دریایی هامور استفاده نمودند.

اختلاف بین وزن واقعی(۲۸ کیلودالتون) و وزن قابل پیش بینی (۲۲ کیلودالتون) این پروتئین به استفاده از سیستم‌های بیانی حشرات که ممکن است نتیجه اصلاحات پس از ترجمه مثل گلیکوزیلاسیون و یا فسفوریلاسیون باشد نسبت داده می‌شود. با این حال با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی برای بیان و خالص سازی VP28 نوترکیب محافظت میگو در برابر ویروس لکه سفید مشاهده شده است.

در مطالعه حاضر پس از بیان پروتئین نوترکیب VP28، وزن مورد انتظار حدود ۱۹/۳۶ کیلو دالتون بود که در آزمایش SDS-PAGE بررسی و تأیید شد.

نتایج آزمایش چالش اول (پایان روز پنجم پس از تغذیه پست لاروها با ناپلی آرتمیای نوترکیب)نشان داد که میانگین درصد تلفات در گروه حاوی پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) برابر ۱۴/۴۴٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۸۰/۳۰٪ بود.

در گروهی که از باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal) تغذیه کرده بود میانگین درصد تلفات ۳۳/۳۳٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۵۴/۵۴٪ و در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) میانگین درصد تلفات ۴۸/۸۸٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی

1 . VNN

۳۳/۳۳٪ بود. همچنین در بررسی‌های آماری بین ۳ گروه مورد آزمایش از نظر میزان بازماندگی نسبی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$). به این صورت که در گروه تغذیه شده با پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) بالاترین درصد بازماندگی نسبی و در گروه تغذیه شده با باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) پایین‌ترین درصد بازماندگی نسبی مشاهده گردید.

در آزمایش چالش دوم (۲۵ روز پس از اتمام تغذیه با آرتمیا) در گروه پلاسمید نوترکیب (pMal+VP28) میانگین درصد تلفات ۲۳/۳۳٪ و میانگین بازماندگی نسبی ۶۹/۱۱٪ بود. در گروه باکتری دارای پلاسمید غیر نوترکیب (pMal) میانگین درصد تلفات ۴۷/۷۷٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۳۶/۷۶٪ و در گروه باکتری بدون پلاسمید نوترکیب (TG1) میانگین درصد تلفات ۷۲/۲۲٪ و میانگین درصد بازماندگی نسبی ۴/۴۱٪ بود. همچنین در بررسی‌های آماری بین ۳ گروه مورد آزمایش در چالش دوم نیز از نظر میزان بازماندگی نسبی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$).

در آزمایش مواجهه سازی اول که ۲ روز پس از ایمن‌سازی میگوها انجام شده بود گروهی از میگوها که پروتئین نوترکیب VP28 را دریافت کرده بودند بالاترین میزان بازماندگی نسبی را در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان دادند و بتدریج در مواجهه سازی دوم که ۲۵ روز پس از مواجهه اول بود باز هم این گروه دارای بالاترین میزان بازماندگی نسبی در میان گروه‌های مورد آزمایش بود ولی این میزان در مقایسه با آزمایش اول کاهش یافته بود. در گروه‌های دیگر نیز این سیر نزولی مشاهده گردید به طوری‌که در گروهی که از باکتری بدون پلاسمید تغذیه کرده بود تقریباً هیچ گونه محافظتی در برابر بیماری مشاهده نشد. در حالی‌که در گروهی که از پلاسمید غیر نوترکیب تغذیه نموده بود ۳۶/۷۶٪ میزان بازماندگی نسبی مشاهده گردید که این اختلاف در

بازماندگی را می‌توان به وجود پروتئین نوترکیب VP28 در گروه اول نسبت داد. همچنین کاهش میزان بازماندگی نسبی در گروه سوم نشان‌دهنده عدم تحریک سیستم ایمنی میگوها با سلول باکتری بوده است.

Namikoshi و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشاهده نمودند که پروتئین‌های VP28 و VP26 بیان شده در باکتری *اشریشیا کلی* و ویروس غیرفعال شده، میگوی کوروما[1] را در برابر بیماری لکه سفید محافظت می‌کند. نتایج نشان داد که تزریق پروتئین نوترکیب VP28 برای دو مرتبه ( هر بار ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم میگو) بالاترین محافظت را در برابر ویروس لکه سفید با ۹۵٪ بازماندگی نسبی ایجاد نمود.

Witteveldt و همکاران در سال ۲۰۰۴b امکان واکسیناسیون بالقوه با استفاده از پروتئین نوترکیب VP28 که انتهای آمینی آن به پروتئین متصل شونده به مالتوز وصل شده و در باکتری *اشریشیا کلی* بیان شده بود را بررسی نمودند. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که واکسیناسیون با VP28 نوترکیب ( ۴ میکروگرم به ازای هر گرم وزن میگو) بازماندگی معنی داری را ۲ روز پس از چالش ایجاد کرد اما پس از ۲۵ روز اثر آن از بین رفت.

در تحقیق حاضر نیز از پروتئین نوترکیبی (VP28) استفاده شد که انتهای آمینی آن به پروتئین متصل شونده به مالتوز جوش خورده و در باکتری *اشریشیا کلی* بیان شده بود با این تفاوت که از روش خوراکی تغییر شکل یافته برای ایمن سازی و چالش به روش غوطه‌وری استفاده گردید و در پایان در مقایسه با تحقیق Witteveldt و همکاران در سال ۲۰۰۴b نتایج بهتری حاصل شد.

1. kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*)

Du و همکاران (۲۰۰۶)، اثر بخشی پروتئین نوترکیب VP28 بیان شده در باکتری *اشریشیا کلی* و سلول حشرات را در خرچنگ دراز آب شیرین با یکدیگر مقایسه کردند. آن‌ها دریافتند که خرچنگ‌های تزریق شده با VP28 نوترکیب بیان شده در سلول‌های حشرات (۲/۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن بدن میگو) محافظت بهتری را نسبت به پروتئین بیان شده در *اشریشیا کلی* (۲/۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن بدن میگو) نشان می‌دهند. VP28 بیان شده در سلول حشرات درصد بقاء نسبی ۹۵٪ را ایجاد نمود در حالی‌که VP28 بیان شده در باکتری *اشریشیا کلی* ۴۳/۵ درصد بقاء نسبی داشت. آن‌ها پیشنهاد نمودند اصلاحات پس از ترجمه VP28 ممکن است در سلول‌های حشرات به درستی انجام شده باشد.

آزمایش مشابه‌ی با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی برای VP28 توسط Jha و همکاران (۲۰۰۶a) انجام شد که بر روی امکان تزریق واکسن VP28 نوترکیب بیان شده در مخمر *پیچیا پاستوریس*[1] بر علیه ویروس لکه سفید در خرچنگ دراز آب شیرین گونه *پی. کلارکی*[2] تحقیق کردند. این محققین دریافتند که تزریق ۲ میکروگرم پروتئین نوترکیب VP28 به ازای هر گرم وزن بدن خرچنگ، آن‌ها را دربرابر ویروس لکه سفید محافظت می‌کند به طوری‌که در روز ۳ پس از واکسیناسیون درصد بقاء نسبی ۹۱٪ و در روز ۲۱ درصد بقاء ۷۸٪ بود. ایشان همچنین بر روی اثربخشی روش‌های خوراکی، تزریق داخل عضلانی ( ۲ میکروگرم پروتئین به ازای هر گرم وزن بدن) و غوطه‌وری در برابر ویروس لکه سفید در خرچنگ دراز آب شیرین تحقیق نمودند. نتایج نشان داد که میزان تلفات در حالت واکسیناسیون به روش غوطه‌وری بالاتر بود. در آزمایش چالش در روزهای ۵ و ۲۱ پس از غوطه‌وری درصد بقاء نسبی ۴۹٪ به دست آمد و به دنبال آن

1. *Pichia pastoris*
2. *P. clarkii*

آزمایش خوراکی انجام شد که در چالش روز ۳ و ۲۱ پس از تجویز خوراکی واکسن، درصد بقاء نسبی به ترتیب ۵۲ و ۴۹ درصد بود و در تجویز به روش تزریقی میزان بقاء نسبی در روزهای ۳ و ۲۱ چالش به ترتیب ۵۰/۵ و ۴۳/۱ درصد بود. هر چند که تفاوت معنی‌داری بین درصدهای بقاء نسبی در ۳ گروه مورد آزمایش مشاهده نشد اما روش خوراکی واکسیناسیون با VP28 را روش کاربردی‌تری عنوان نمودند زیرا تزریق میگوها به صورت انفرادی به دلیل وجود تعداد بالای میگو در هنگام واکسیناسیون مقدور نمی‌باشد.

در پژوهش حاضر نیز از روش خوراکی استفاده گردید اما این روش خوراکی به دلیل این که در مراحل اولیه رشد میگوها می‌باشد از راحتی و کارآیی بالاتری نسبت به روش خوراکی در استخرهای خاکی پرورش برخوردار است و نیز با توجه به میزان باکتری مورد نیاز مقرون به صرفه‌تر نیز می‌باشد.

Witteveldt و همکاران (b ۲۰۰۴ و ۲۰۰۶) ژن VP28 را در باکتری *اشریشیا کلی* بیان نمودند و دریافتند زمانی‌که با پلیت خوراکی تجاری میگو مخلوط شود به طور قابل ملاحظه‌ای بازماندگی را در برابر چالش ویروس لکه سفید در میگوی ببری سیاه و میگوی سفید غربی افزایش می‌دهد.

Caipang و همکاران در سال ۲۰۰۸ از باکتری گرم مثبت *بروی‌باسیلوس بروی‌س*[1] برای تولید پروتئین نوترکیب VP28 ویروس لکه سفید استفاده نمودند آن‌ها دریافتند که تغذیه با پروتئین نوترکیبVP28 به میزان ۲۵ میکروگرم برای هر گرم وزن میگو به مدت ۷ روز قبل از چالش با ویروس لکه سفید، در روز سوم پس از تغذیه بالاترین میزان بازماندگی (۹۲/۸٪) را نشان

1. *Brevibacillus brevis*

داد. سطح حفاظت در میگوها در برابر بیماری به طور قابل توجه‌ی ۲ هفته پس از تغذیه و زمانی‌که میزان تغذیه با VP28 کاهش یافت کم شد. همچنین در این پژوهش مشخص شد که قابلیت حفاظت VP28 نوترکیب ممکن است با میزان و مدت تغذیه مرتبط باشد.

Mavichak و همکاران در سال ۲۰۰۹ از باکتری گرم مثبت برویباسیلوس کوشینسیس[1] برای بیان پروتئین VP28 نوترکیبی که دارای نقص در انتهای کربوکسیل و آمین و نقص در یک انتهای آمین (برای افزایش قدرت بیان پروتئین) بود استفاده نمودند و اثربخشی روش‌های خوراکی و تزریق داخل عضلانی آن‌ها را مقایسه کردند. یافته‌های پژوهش نشان داد که تغذیه با پروتئین نوترکیب VP28 با نقص در انتهای آمینی به میزان ۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن بدن میگو در روز به مدت یک هفته میگوها را در برابر ویروس لکه سفید محافظت نمود در حالی‌که در شرایط مشابه با تغذیه با VP28 دارای نقص در انتهاهای آمین و کربوکسیل این حالت مشاهده نشد. علاوه بر این یک بار تزریق داخل عضلانی به میزان ۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن میگو محافظت بالاتری را نسبت به روش خوراکی یک هفته‌ای فراهم نمود.

همچنین این محققین با پوشاندن پروتئین نوترکیب VP28 دارای نقص در انتهای آمین با لیپوزوم، میزان دریافت آن را از روش خوراکی افزایش دادند و تغذیه با این پروتئین به مدت ۳ روز محافظت بالاتری نسبت به پروتئین فاقد لیپوزوم ایجاد نمود. با بررسی بافت شناسی مشخص شد که استفاده از لیپوزوم می‌تواند کارآیی VP28 را در بافت میگو بهبود ببخشد (Mavichak و همکاران، ۲۰۱۰).

1. *B. choshinensis*

Xu و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر پروتئین نوترکیب VP28 بیان شده در سیستم بیانی کرم ابریشم را در خرچنگ دراز آب شیرین بررسی نمودند. نتایج نشان داد که خرچنگ‌های درمان شده با VP28 بقاء بهتر و معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۹۴/۷٪).

همچنین Jha و همکاران (۲۰۰۷)، اثر تجویز خوراکی VP28 بیان شده در مخمر *پیچیا پاستوریس* را برعلیه ویروس لکه سفید در خرچنگ دراز آب شیرین گونه *پی.کلارکی* مورد ارزیابی قرار دادند و دریافتند که بالاترین درصد بقاء نسبی مربوط به سیستم بیانی مخمر سونیکه شده بود (۸۶٪ و ۷۲٪ در روزهای ۳ و ۲۱ چالش).

واکسیناسیون به روش تزریقی روشی ساده برای ایجاد اثرات محافظت کنندگی پروتئین‌های نوترکیب در برقراری محافظت در برابر بیماری لکه سفید می‌باشد اما یک روش کاربردی در شرایط معمول پرورش میگو نیست. بنابراین واکسیناسیون به روش خوراکی به عنوان یک روش مناسب و کاربردی ایمن سازی میگوهای پرورشی در نظر گرفته شده است. از این رو در پژوهش حاضر راهبرد ایمن سازی به روش خوراکی تغییر یافته برای بررسی اثرات محافظتی پروتئین VP28 در برابر ویروس لکه سفید در میگوی سفید غربی استفاده شد.

ایمن سازی با VP28 منجر به تلفات کمتری در مقایسه با گروه‌هایی شد که با پلاسمید غیر نوترکیب واکسینه شده بودند و این نشان دهنده آن است که محافظت ایجاد شده می‌تواند به علت پروتئین نوترکیب باشد.

همچنین محافظت مشاهده شده ناشی از ایمن سازی با پروتئین نوترکیب غشاء را می‌توان فقط به علت وجود پروتئین نوترکیب دانست و اثر هم‌افزایی سلول باکتری بیان کننده پروتئین

مطرح نمی‌باشد و دلیل این موضوع تلفات تجمعی بالا در گروه‌های واکسینه شده با با باکتری غیر نوترکیب است.

با توجه به تحقیقات صورت گرفته اثرات کلی واکسیناسیون خوراکی در فراهم آوردن مقاومت در برابر بیماری لکه سفید در مقایسه با واکسیناسیون تزریقی پایین‌تر است که ممکن است به دلایل مختلف مانند مقدار دوز واقعی واکسن دریافت شده توسط میگو، از دست دادن پروتئین واکسن به علت شستشو و میزان خود واکسن باشد. با وجود این، نتایج حاصل از واکسیناسیون خوراکی به عنوان تنها راه عملی ایمن سازی بسیار امیدوار کننده بوده و محققین بهبود بیشتر را نیازمند دستیابی به ساخت واکسن‌های مؤثرتر و سازگارتر از نظر حفاظت می‌دانند. به همین دلیل استفاده از پروتئین نوترکیب خوراکی که توسط ناپلی آرتمیا به پست لارو میگوها منتقل شود پیشنهاد و اجرا گردید که در پایان مشاهده شد که علیرغم این که در سنین ابتدایی میگو ایمن سازی صورت گرفت محافظت ایجاد شده در برابر چالش تا روز ۲۵ پس از ایمن سازی باقی ماند.

بر اساس نتایج چنین بر می‌آید که استفاده از پروتئین VP28 که از پروتئین‌های غشاء ویروس لکه سفید می‌باشد می‌تواند در تحریک سیستم ایمنی میگوها برای مقابله با ویروس لکه سفید کارساز بوده و استفاده از روش خوراکی به شکل کپسوله کردن زیستی علاوه بر این که از روش تزریقی ساده‌تر و بدون عوارض جانبی است در این مطالعه در میگوی سفید غربی در مقایسه با سایر پژوهش‌ها از کارآیی بالاتری برخوردار بود.

## پیشنهادات:

با توجه به نتایج حاصل شده در این پژوهش موارد زیر پیشنهاد می‌گردد:

۱- استفاده از سیستم‌های بیانی دیگر به منظور بررسی بیشتر کارآیی پروتئین تولیدی.

۲- استفاده از دیگر پروتئین‌های غشاء ویروس که در تحقیقات متعددی استفاده شده توصیه می‌شود.

۳- استفاده از ناپلی آرتمیای کپسوله شده زیستی به صورت منجمد یا خشک شده و مقایسه آن با حالت تازه.

۴- با توجه به این که ثابت بودن این قسمت از ژنوم ویروس لکه سفید در مطالعات متعددی به اثبات رسیده و در تحقیق حاضر نیز این مقایسه انجام شد استفاده از این ژن در طراحی و ساخت کیت‌های تشخیصی توصیه می‌شود.

۵- با تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال بر علیه این پروتئین می‌توان از روش‌های تشخیصی سرم شناسی سریع بهره برد.

## منابع:


۱. افشار نسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ اسکندری، غلامرضا؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام و لالویی، فرامرز (۱۳۸۵). گزارش نهایی بررسی و تعیین منبع بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه آبادان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۵ ص.

۲. افشارنسب، محمد؛ سیدمرتضایی، سیدرضا؛ آهنگرزاده، مینا؛ هوشمند، حسین؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی، الهام؛ سبزعلیزاده، سارا و محسنی‌نژاد، لفته، (۱۳۸۸). بررسی وضعیت بهداشت و بیماری های مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور.،گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۳. آمار نامه شیلات ایران (۱۳۸۴). میزان میگوی پرورشی در سال ۱۳۸۴. انتشارات سازمان شیلات ایران ۶۱ ص.

۴. تخم افشان، محمد؛ تمجیدی، بهروز؛ لالویی، فرامرز؛ کر، نیازمحمد و مهرابی، محمدرضا، (۱۳۸۳). گزارش نهایی ردیابی بیماری لکه سفید در میگوی پرورشی سفید هندی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران .۴۱ ص.

۵. سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۷-۱۳۷۱ . میزان میگوی پرورشی در سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۷ . انتشارات سازمان شیلات ایران ص۲۵.

۶. سید مرتضایی، سید رضا؛ آهنگرزاده،مینا؛ هوشمند،حسین؛ کر، نیازمحمد؛ جرفی،الهام؛ سبزعلیزاده،سارا و محسنی‌نژاد،لفته، ( ۱۳۸۸)، بررسی وضعیت بهداشتی مراکز تکثیر و پرورش میگوی کشور(گزارش استان خوزستان)، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.

۷. صنعت میگو در استان خوزستان ، روابط عمومی شیلات خوزستان . ۱۶ ص

8. Adger, W. N.(1998). Sustainability and social resilience in coastal resource use. CSERGE working paper GEC 97-23. Center for Social and Economic Research on the Global Environment. University of East Anglia and University College, London, England.

9. Alabi, A. O., Jones, D. A. And Latchford, J. W.(1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. Aquaculture, 178: 1-11.

10. Alday de Graindorge, V. and Flegel, T.W.(1999). Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Multimedia Asia Co. Ltd. Bangkok 10400, Thailand.

11. Anil, T.M., Shankar, K.M., Mohan, C.V.,(2002). Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Diseases in Aquatic Organisms, 51, 67-75.

12. Arts, J.A.J., Cornelissen, F.H.J., Cijsouw, T., Hermsen, T., Savelkoiul, H; F.J., Stet, R.J.M.,(2007). Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology, 23, 504-513.

13. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA and Struhl, K. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. 2nd edition. John Wiley and sons. New York. Pp: A1-15.

14. Badhul Haq, MA ., Vignesh, R., Srinivasan, M.,(2012). Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 73-77.

15. Balasubramanian, G., Sarathi, M., Kumar, S.R., Sahul Hameed, A.S., (2007). Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp.Aquaculture, 263, 15-19.

16. Balasubramanian, G., Sudhakaran, R., Musthaq, S.S., Sarathi, M., Sahul Hameed, A.S., (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. Journal of Fish Diseases, 29, 569-572.

17. Bardhan, P. (2006). Globalization and rural poverty. World Development, 34, 1393–404.

18. Barton, G.M.,(2007).Viral recognition by toll-like receptors. Seminars in Immunology, 19, 33-40.

19. Berteau, O. and Mulloy, B., (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active towardthis class of polysaccharide. Glycobiology, 13, 29-40.

20. Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., (2005). Disease and health management in Asian Aquaculture. Veterinary Parasitology, 132, 249-272.

21. Bonnichon, V., Lightner, D.V., Bonami, J-R., (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 72, 179-184.

22. Brey, P.T., Lee, W., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M., Ashida, M., (1993). Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90, 6275-6279.

23. Bright Singh, I.S., Manjusha, M., Pai, S.S., Philip, R., (2005). *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot synrome virus. Diseases in Aquatic Organisms, 66, 265-270.

24. Caipang, C.M.A. Verjan, N. Ooi, E.L. Kondo, H. Hirono, I. Aoki, T. Kiyono, H. and Yuki Y. (2008). Enhanced survival of shrimp, *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. Fish and Shellfish Immunology, 25:315-320.

25. Chang P.S., Lo, C.F., Kou, G.H. and Chen, S.N., (1993). Purification and amplification of DNA from Penaeus monodon-type baculovirus (MBV). Journal of Invertebrate Pathology, 62, 116-120.

26. Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Lo, C. F., Kou, G. H. And Liao, I. C., (1999). Effect of dietary β-1, 3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) inpostlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 36: 163-168.

27. Chang, C-F., Su, M-S., Chen, H-Y., Liao, I-C., (2003). Dietary β-1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of Penaeus monodon challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 15, 297-310.

28. Chang, P.S., Lo C.F., Wang Y.C. & Kou, G.H. (1996). Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp

*Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases in Aquatic Organisms, 27, 131–139.

29. Chang, P-S., Chen, L-J., Wang, Y-C., (1998). The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. Aquaculture, 166, 1-17.

30. Chang, Y.S., Peng, S.E., Wang, H.C., Hsu, H.C., Ho, C.H., Wang, C.H., Wang, S.Y., Lo, C.F. and Kou, G. H., (2001). Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. Marine Biotechnology, 3: 163–171.

31. Chin-Chiu Lin, John Han-You Lin, Ming-Shyan Chen, Huey-Lang Yang., (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*)., Aquaculture, 268 ,265–273.

32. Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K., Phongdara, A., (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture, 233, 23-30.

33. Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C. & Lo, C.F., (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases in Aquatic Organisms, 23, 165–173.

34. Chou, H.Y., Huang, C.Y., Lo, C.F. & Kou, G.H., (1998). Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture, 164, 263–276.

35. Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V., (2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and Shellfish Immunology, 21, 372-384.

36. Claydon, K., Cullen, B., Owens, L., (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. Diseases in Aquatic Organisms, 62, 265-268.

37. Cowley, J.A., McCulloch, R.J., Rajendran, K.V., Cadogan, L.C., Spann, K.M., Walker, P.J., (2005). RT-nested PCR detection of Mourilyan virus in Australian *Penaeus monodon* and its tissue distribution in healthy and moribund prawns. Diseases in Aquatic Organisms, 66, 91-104.

38. Dehghan M., Jafariyan H., Habibi Rezai M., Amoozagar M.A., Sahandi J., (2011). Potential of Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Enrichment with Two

Species of Bacillus and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 3 (6): 523-528.

39. Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. And Bachere, E., (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science, 113: 461-469.

40. Devaraja, T. N., Otta S. K., Shubha, G., Karunasagar, I., Tauro, P. And Karunasagar, I., (1998). Immunostimulation of shrimp through oraladministration of *Vibrio* bacterin and yeast glucan In: Advances in shrimp biotechnology. Flegel, T. W., (Ed), National centre for genetic engineering and Biotechnology, Bangkok. pp 167 - 170.

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

42. Du, H., Li, W-F., Xu, Z-R., Kil, Z-S., (2006b). Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. Diseases in Aquatic Organisms, 71, 175-178.

43. Dupuy, J-W., Bonami, J-R., Roch, Ph., (2004). A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. Journal of Fish Diseases, 27, 57-64.

44. Durand, S., Lightner, D.V., Nunan, L.M., Redman, R.M., Mari, J. & Bonami, J.R., (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 27, 59–66.

45. Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M. & Bonami, J. R., (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White spot syndrome baculovirus (WSSV). Diseases in Aquatic Organisms, 29, 205-211.

46. Durand, S.V., Tang, K.F.J. and Lightner, D.V., (2000). Frozen commodity shrimp: Potential Avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health, 12, 128–135.

47. Durand, S.V, Lightner, D.V., (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Fish Diseases, 25, 381-389.

48. Elanchezhiyan, M., Rajarajan, S., Rajendran, P., Subramanian, S., Thyagarajan, S.P., (1993).Antiviral properties of the seed extract of an Indian medicinal plant,

*Pongamia pinnata*,Linn., against herpes simplex viruses:in-vitro studies on vero cells. Journal of Medical Microbiology, 38, 262-264.

49. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Sanz, V.A., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., (2005). In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. Diseases in Aquatic Organisms, 66, 163-170.

50. Escobedo-Bonilla, C.M., Audoorn, L., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., (2006). Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. Diseases in Aquatic Organisms, 68, 181-188.

51. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., (2007). Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 74, 85-94.

52. Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. & Nauwynck, H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. Journal of Fish Diseases, 31, 1–18.

53. FAO Fisheries Department. State of world aquaculture., ( 2006). FAO Fisheries Technical Paper. No. 500. Rome, FAO. 134p.

54. FAO Fisheries Department. State of world Aquaculture. (2012). FAO Fisheries Technical Paper. Rome. 209 pp.

55. FAO/NACA, (2003). Myanmar Aquaculture and Inland Fisheries. FAO, Bangkok, Thailand, 60 p.

56. Fegan, D.F., Clifford III, H.C., (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms.In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture. The world aquaculture society, BatonRouge, Louisiana, USA, 168-198 pp.

57. Feigon, L., (2000). A harbinger of the problems confronting China's economy and environment: the great Chinese shrimp disaster of 1993. Journal of Contemporary China, 9, 323-332.

58. Filee, J. and Chandler, M. (2008). Convergent mechanisms of genome evolution of large and giant DNA viruses. Research in Microbiology, 159, 325-331.

59. Flegel, T.W., (2001). The shrimp response to viral pathogens. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp

culture, Aquaculture. The world aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 254-278 pp.

60. Flegel, T.W., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S., Pasharawipas, T., (2004). Presence of multiple viruses in nondiseased cultivated shrimp at harvest. Aquaculture, 240, 55-68.

61. Flegel, T.W., (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture, 258, 1-33.

62. Flegel, T.W., (2007). Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Developmental and comparative immunology, 31, 217-231.

63. Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z.J., Alcocer-Gonzalez, J.M., Rosales-Encinas, J.L. & Ibarra-Gamez, C. (2004). White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. Aquaculture, 242, 53–68.

64. Global Aquaculture Alliance (1999a). Shrimp white spot disease in Latin America an update. Global Aquaculture Advocate, 2, 34–45.

65. Global Aquaculture Alliance (1999b). Shrimp white spot virus confirmed in Central America. Global Aquaculture Advocate, 2, 1–5.

66. Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., (2006). "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture, 253, 105-113.

67. Gopalakrishnan, A., Parida, A., (2005). Incidence of loose shell syndrome disease of the shrimp *Penaeus monodon* and its impact in the grow-out culture. Current Science, 88, 1148-1154.

68. Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragón, L., Salazar, M., (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) – infected *Litopenaeus vannamei*? Diseases in Aquatic Organisms, 54, 73-78.

69. Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, G., Salazar, M.,(2006). Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Peaneus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 68, 175-180.

70. Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. Developmental and comparative immunology, 25, 565-577.

71. Guan, Y., Yu, Z., Lia, C., (2003). The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. Journal of Invertebrate Pathology. 83, 257-260.

72. Guohua Yi, Zhimin Wang, Yipeng Qi, Lunguang Yao, Juan Qian and Longbo Hu (2004). Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37(6), 726-734.

73. Hayashi, T. and Hayashi, K., (1996). Calcium-spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication from blue green alga *Spirulina platensis*. Journal of Natural Products, 59, 83-87.

74. He, N., Qin, Q., Xu, X., (2005). Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus resistant (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. Antiviral Research, 66, 39-45.

75. Hennig, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natsukari, Y. and Takahashi, Y. (1998). Analyses of hemolymph immunoparameters in kurama shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. Fish Pathology, 33, 389-393.

76. Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., Barron, B.L., (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. Antiviral Research, 56, 279-285.

77. Horowitz, A., and Horowitz, S., (2001). Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: Browdy, C.L. and Jory, D.E., editors. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 199-218 pp.

78. Hossain, M.S., Otta, S.K., Chakraborty, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., (2004). Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. Aquaculture, 237, 59-71.

79. Hossain, S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. & Karunasagar, I., (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. Aquaculture, 198, 1–11.

80. Hsu, H-C., Lo, C-F., Lin, S-C., Liu, K-F., Peng, S-E., Chang, Y-S., Chen, L-L., Liu, W-J., Kou, G-H., (1999). Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. Diseases in Aquatic Organisms, 39, 13-19.

81. Huang, J. XL. Song, J.Yu and C.H. Yang. (1994). Baculoviral and haematopoietic necrosis- pathology of the shrimp explosive epidemic disease. Yellow Sea Fishery Reaserch Institute. Qingdae, P.R. China.

82. Huang, C., and Song, Y.L., (1999). Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). Developmental and Comparative Immunology, 23, 545-552.

83. Huang, C., Zhang, X., Lin, Q., Xu, X., Hew, C.L., (2002a). Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. Journal of General Virology, 83, 2385-92.

84. Huang, C., Zhang, X., Lin, Q., Xu, X., Hu, Z., Hew, C.L., (2002b). Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. Molecular and Cellular Proteomics, 1, 223-231.

85. Huang, R., Xie, Y., Zhang, J., Shi, Z., (2005). A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. Journal of General Virology, 1357-61.

86. ICTV (2008). Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee to rename an existing virus name.

87. Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K. & Hiraoka, M. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology, 29, 149–158.

88. Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno,N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. And Takahashi, Y., (1989).Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oraladministration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164: 277-288.

89. Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R., (2006). Characterization of *Vibrio spp*. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the World Aquatic Society, 37, 523-532.

90. Jesus, G. S., Gabriel, A. and Humberto, M., (2007). White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. Aquaculture Research, 38, 1339–1354.

91. Jha, R.K. Xu, Z.R. and Pandey, A., (2006a). Protection of Procambarus clarkia against white spot syndrome virus using recombinant subunit injection vaccine expressed in *Picha pastoris*. Fisheries Science, 72:1011-1019.

92. Jha, R.K. Xu, Z.R. Shen, J. Bai, S.J. Sun, J.Y. and Li, W.F., (2006b). The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. Immunology Letters, 105:68-76.

93. Jha, R.K. Xu, Z.R. Bai, S.J. Sun, J.Y. Li, W.F. and Shen, J., (2007). Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. Fish and Shellfish Immunology, 224:295-307.

94. Jian, X-F., Lu, L., Chen, Y-G., Chan, S-M., He, J-G., (2005). Comparison of a novel in situ polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 67, 171-176.

95. Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Söderhäll, K. and Söderhäll, I., (2001). Experimental infection of White spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Diseases in Aquatic Organisms, 47, 151-157.

96. Jiravanichpaisal, P., Soderhall, K., and Soderhall, I., (2004). Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish and Shellfish Immunology, 17, 265-275.

97. Jory, D.E., editors, (2001). Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture. The world aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 104-152.

98. Kanchanaphum, P., Wonteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 34, 1-7.

99. Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., Itami, T., (1998). Detection of white spot syndrome in cultured peaneid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture, 164, 243-251.

100. Keith, I. R., Paterson, W. D., Airdrie, D. And Boston, L. D., (1992). Defense mechanisms of the American lobster (*Homarus americanus*): vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. Fish and Shellfish Immunology, 2: 109-119.

101. Khoa, L.V., Hatai, K., Aoki, T., (2004). *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. Journal of Fish Diseases, 27, 507-515.

102. Kiatpathomchai, W., Boonsaeng, V., Tassanakajon, A., Wongteerasupaya, C., Jitrapakdee, S., Panyim, S., (2001). A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 47, 235-239.

103. Kim, C.S., Kosuke, Z., Nam, Y.K., Kim, S.K., Kim, K.H.,( 2007). Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. Fish and Shellfish Immunology, 23, 242-246.

104. Kimbrell, D. A. And Beutler, B., (2001). The evolution and genetics of innate immunity. Nature Reviews Genetics, 2: 256-267.

105. Kono, T., Savan, R., Sakai, M., Itami, T., (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods, 115, 59-65.

106. Kou, G. H., Chen, S. N. And Huang, S. L., ( 1989). Studies on bacterial infection and vaccination trials for culture *Penaeus monodon* in Taiwan. Abstract of the Fourth EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 24-28 September 1989, Santiago de Compostella, Spain, 94 pp.

107. Kou, G.H., Peng, S.E., Chiu, Y.L. and Lo, C.F.,(1998). Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: Advances in Shrimp Biotechnology (Flegel T.W., ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 267–271.

108. Kurtz, J. And Franz, K., (2003). Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity. Nature, 425: 37-38.

109. Lan, Y., Lu, W., Xu, X., (2002). Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. Virus Research, 90, 269-274.

110. Lee, S.Y., Söderhäll, K., (2002). Early events in crustacean innate immunity. Fish and Shellfish Immunology, 12, 421-437.

111. Leonardo, V.A. Di., Bonnichon, V., Roch, P., Parrinello, N., Bonami, J-R., (2005). Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera Marsupeaneus and Palaemon. Journal of Fish Diseases, 28, 565-569.

112. Leu, J.H., Tsai, J.M., Wang, H.C., Wang, A.H., Wang, C.H., Kou, G.H., Lo, C.F., (2005). The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. Journal of Virology, 79, 140-149.

113. Lewis, R.R. III., Phillips, M.J., Clough, B. & Macintosh, D.J., (2003). Thematic review on coastal wetland habitats and shrimp aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium, pp. 81.

114. Li, D-F., Zhang, M-C., Yang, H-J., Zhu, Y-B., Xu, X., (2007). β -integrin mediates WSSV infection. Virology, 368,122-132.

115. Li, H., Zhu, Y., Xie, X., Yang, F., (2006). Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. Virus Research, 115, 76-84.

116. Li, H-X., Meng, X-L., Xu, J-P., Lu, W., Wang, J., (2005). Protection of crayfish, Cambarus *clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. Journal of Fish Diseases, 28, 285-291.

117. Li, L., Lin, S., Yang, F., (2006). Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. Journal of General Virology, 87, 1909-1915.

118. Li, L., Xie, X., Yang, F., (2005). Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31.Virology, 340,125-32.

119. Li, L.J., Yuan, J.F., Cai, C.A., Gu, W.G., Shi, Z.L., (2006). Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. Archives of Virology, 151, 1309-1317.

120. Li, P., Burr, G.S., Gatlin, D.M., Hume, M.E., Patnaik, S., Castille, F.L. and Lawrence, A.L., (2007). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. Journal of Nutrition, 137, 2763–8.

121. Lightner, D.V., (1996). A Hand Book of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

122. Lightner, D.V., (2003). Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undesirables (C.-S. Lee & P.J. O'Bryen, eds.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. pp. 81-116.

123. Lightner, D.V., (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. Journal of the World Aquaculture Society, 36, 229-247.

124. Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L. and Redman, R.M., (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Journal of Aquatic Animal Health, 10, 271–281.

125. Lightner, D.V., Redman, R.M., (1993). A Putative Iridovirus from the Penaeid Shrimp Protrachypene precipua Burkenroad (Crustacea: Decapoda). Journal of Invertebrate Pathology, 62, 107-109.

126. Lightner, D.V., and Redman, R.M., (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture, 164, 201-220.

127. Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L. and Hasson, K.W. (1997). Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Scientific and Technical Review, 16, 146–160.

128. Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Söderhäll, K.,(2006). Antipolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Virology, 80, 10365-10371.

129. Liu, W., Wang, Y.T., Tian, D.S., Yin, Z.C., Kwang, J., (2002). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). Diseases in Aquatic Organisms, 49, 11-18.

130. Liu, Y., Wu, J., Song, J., Sivaraman, J., Hew, C.L., (2006). Identification of a Novel Nonstructural Protein, VP9, from White Spot Syndrome Virus: Its Structure Reveals a Ferredoxin Fold with Specific Metal Binding Sites. Journal of Virology, 80, 10419-10427.

131. Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. Diseases in Aquatic Organisms, 25, 133–141.

132. Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su M.S.,Wang, C.H. and Kou, G.H. (1996b). White spot

syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases in Aquatic Organisms, 27, 215–225.

133. Lo, C.F., Ho, C-H., Chen, C-H., Liu, K-F., Chiu, Y-L., Yeh, P-Y., Peng, S-E., Hsu, H-C., Liu, H-C., Chang, C-F., Su, M-S., Wang, C-H., Kou, G-H., (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Diseases in Aquatic Organisms, 30, 53-72.

134. Lotz, J.M. and Soto, M.A., (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 50, 199–209.

135. Luo, T., Li, F., Lei, K., Xu, X., (2007). Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Peaneus monodon*. Molecular Immunology, 44, 1516-1523.

136. Luo, T., Zhang, X., Shao, Z., Xu, X., (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. FEBS Letters, 551, 53-57.

137. Makesh, M., Koteeswaran, A., Chandaran, N.D.J., Manohar, B.M., Ramasamy, V., (2006). Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. Aquaculture, 261, 64-71.

138. Manivannan, S., Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I., (2002). Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. Diseases in Aquatic Organisms, 48, 233-236.

139. Marks, H., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. & van Hulten, M.C.W., (2004). Genetic variation amongisolates of white spot syndrome virus. Archives of Virology, 149, 673–697.

140. Marks, H., van Duijse, J.J.A., Zuidema, D., van Hulten, M.C.W. and Vlak, J.M., (2005). Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. Virus Research, 110, 9-20.

141. Marks, H., Vorst, O., van Houwelingen, A.M., van Hulten, M.C. and Vlak, J.M., (2005). Gene-expression profiling of white spot syndrome virus in vivo. Journal of General Virology, 86, 2081–2100.

142. Mavichak, R. Kondo, H. Hirono, I. Aoki, T. Kiyono, H. and Yuki, Y., (2009). Protection of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* against white spot virus following administration of N-terminus truncated recombinant VP28 protein expressed in Gram-positive bacteria, *Brevibacillus choshinensis*. Aquaculture Science, 57:83-90.

143. Mavichak, R. Takano, T. Kondo, H. Hirono, I. Wada, S. Hatai, K. Inagawa, H. Takahashi, Y. Yoshimura, T. Kiyono, H. Yuki, Y. and Aoki, T., (2010). The effect of liposome-coated recombinant protein VP28 against white spot syndrome virus in kuruma shrimp, *Marsupenaeis japonicus*. Journal of Fish Diseases, 33:69-74.

144. Mavichak, R., Kondo H., Hirono I. Aoki T., (2011). The utilization of VP28 gene to protect penaeid shrimps from white spot syndrome virus disease: a review., pp. 157-170. In Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and Aoki, T. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 pp.

145. Mayo, M.A., (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Archives of Virology, 147, 1655-1663.

146. Melena, J., Bayot, B., Betancourt, I., Amano, Y., Panchana, F., Alday, V., Calderón, J., Stern, S., Roch, Ph., Bonami, J-R., (2006). Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. Journal of Fish Diseases, 29, 589-600.

147. Menasveta, P., (2002). Improved shrimp growout systems for disease prevention and environmental sustainability in Asia. Reviws in Fisheries Science, 10, 391-402.

148. Mohan, C.V., (2003). Special introduction: impact on aquatic animal health and trade aquamarkets shrimp season. Manila philipin Parameters and Ectocommensal ciliates on *P . japonicus.* Aquaculture, 10, 269 – 280

149. Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakano, H., Koube, H., Inouye, K. and Oseka, N., (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus Japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study. Fish Pathology, 29, 141-148.

150. Momoyama, K., Hiraoka, M., Venegas, C.A., (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to juveniles of six crustacean species. Fish Pathology, 34, 183-188.

151. Moon, C.H., Do, J.W., Cha, S.J., Yoon,W.J., Kim, S.B., Ko, M.S., Park, M.A., Kim, J.W., Sohn, S.K.,Lee, J.H. and Park, J.W., (2003). Highly conserved sequences of three major virion proteins of a Korean isolate of white spot syndrome virus (WSSV). Diseases in Aquatic Organisms, 53, 11–13.

152. Musthaq, S.S., Sudhakaran, R., Ahmed, V.P.I., Balasubramanian, G., Sahul Hameed, A.S., (2006). Variability in the tandem repetitive DNA sequences of

white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. Aquaculture, 256, 34-41.

153. Nadala, E. C. B. Jr., Tapay, L.M., Cao, S., Loh, P.C., (1997). Detection of yellowhead virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the westerblot technique. Journal of Virological Methods, 69, 39-44.

154. Nakano, H., Hiraoka, M., Sameshima, M., Kimura, T., Momoyama, K., (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments. Fish Pathology, 33, 65-71.

155. Namikoshi, A. Wu, J.L. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, T. Arimoto M. and Muroka K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture, 229:25-35.

156. Natividad, K. D. T., Migo, M.V.P., Albaladejo, J.D., Magbanua, J.P.V., Nomura, N., Matsumura, M., (2006). Simultaneous PCR detection of two shrimp viruses (WSSV and MBV) in postlarvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. Aquaculture, 257, 142-149.

157. Natividad, K.D.T., Hagio, M., Tanaka, M., Nomura, N., Matsumura, M., (2007). White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. Aquaculture, 269, 54-62.

158. Newman, S.G., Bullis, R.A., (2001). Immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application. In: Browdy C.L. and Jory D.E., editors. The NewWave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 226-237.

159. Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E., (2005). *Spiroplasma penaei sp* nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 2317-2322.

160. OIE (World Organisation for Animal Health, formerly Office International des Epizooties)., (2003). Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 4th edition. OIE, Paris.

161. Otta, S.K., Joseph, S.B., Chakraborty, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., (1999). Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. Diseases in Aquatic Organisms, 38, 67–70.

162. Owens, L., (1993). Description of the first haemocytic rod-shaped virus from a penaeid prawn. Diseases in Aquatic Organisms, 16, 217-221.

163. Owens, L., Haqshenas, G., McElnea, C., Coelen, R., (1998). Putative spawner-isolated mortality virus associated with mid-crop mortality syndrome in farmed *Penaeus monodon* from northern Australia. Diseases in Aquatic Organisms, 34, 177-185.

164. Pan, J., Kurosky, A., Xu, B., Chopra, A.K., Coppenhaver, D.H., Singh, I.P., Baron, S., (2000). Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. Antiviral Research, 48, 39-47.

165. Pérez, F., Volckaert, F.A.M., Calderón, J., (2005). Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. Aquaculture, 250, 586-591.

166. Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., Lightner, D.V., (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 47, 13-23.

167. Prior, S., Browdy, C.L., Shepard, E.F., Laramore, R., Parnell, P.G., (2003). Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing taura syndrome or white spot syndrome virus. Diseases in Aquatic Organisms, 54, 89-96.

168. Quéré, R., Commes, T., Marti, J., Bonami, J.R., Piquemal, D., (2002). White spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus simultaneous diagnosis by miniarray system with colorimetry detection. Journal of Virological Methods, 105, 189-196.

169. Rajan, P.R., Ramasamy, P., Purushothaman, V., Brenan, G.P., (2000). White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*. Aquaculture, 184, 31-44.

170. Rameshthangam, P., Ramasamy, P., (2007). Antiviral activity of bis(2-methylheptyl)phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricus. Virus Research, 126, 38-44.

171. Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., (2007). Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. Developmental and Comparative Immunology, 31, 539-547.

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

173. Robalino, J., Payne, C., Parnell, P., Shepard, E., Grimes, A.C., Metz, A., Prior, S., Witteveldt, J., Vlak, J.M., Gross, P.S., Warr, G., Browdy, C.L., (2006). Inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) by normal rabbit serum: implications for the role of the envelope protein VP28 in WSSV infection of shrimp. Virus Research, 118, 55-61.

174. Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A.,(2008). NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. Developmental and Comparative Immunology, 32, 227-238.

175. Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchan, F., de B I., Alday, V. and Calderon, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Journal of Fish Diseases, 26, 439–450.

176. Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, Y. And Aoki, T., (2002). Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. Fish and Shellfish Immunology, 13: 69-83.

177. Rosenberry, B., (1996). World shrimp farming 1996. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 164.

178. Rosenberry, B., (2002). World shrimp farming. Shrimp News International, San Diego, CA, USA. , pp. 3–6.

179. Rossenbery. B., (2005).world shrimp farming. Shrimp news International. San Diego, CA, USA. 276p.

180. Rout, N., Kumar, S., Jaganmohan, S., Murugan, V., (2007). DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. Vaccine, 25, 2778-2786.

181. Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., (2002). The lipopolysaccharide and β-1, 3 glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). Journal of Virology, 76, 7140-7149.

182. Sahtout, A.H., Hassan, M.D., Shariff, M., (2001). DNA fragmentation, an indicator of apotosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). Diseases in Aquatic Organisms, 44, 155-159.

183. Sahul Hameed, A.S., Anilkumar, M., Stephen Raj, M.L., Jayaraman, K., (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquaculture, 160, 31-45.

184. Sahul Hameed, A.S., Sarathi, M., Sudhakaran, R., Balasubramanian, G., Musthaq, S.S., (2006). Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV) infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. Aquaculture, 256, 111-120.

185. Sahul Hameed, A.S., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S. and Yoganandhan, K. (2003). Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). Diseases in Aquatic Organisms, 57, 157–161.

186. Sambrook, J. and Russell, DW. (2001). Molecular cloning, A laboratory manual, vol. 3, 3rd edition. Coldspring harbor, New York, A8, 40-51.

187. Schröder, M., Bowie, A.G., (2005). TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? Trends Immunology, 26, 462-468.

188. Schuur, A; M., (2003). Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. Aquaculture Engineering, 28, 3-20.

189. Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W., Kaya, H.K., (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology**.** Journal of Invertebrate Pathology, 88, 1-7.

190. Shekhar, M.S., Azad, I.S., and Ravichandran, P., (2006). Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. Aquaculture, 261, 1122-1127.

191. Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, P., (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 72, 101-106.

192. Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? Fish and Shellfish Immunology, 15, 71-90.

193. Soderhall, K., (1999). Invertebrate immunity. Developmental and Comparative Immunology, 23: 263-266.

194. Song, Y. L. And Hsieh, Y. T., (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology, 18: 201-209.

195. Song, Y. L., Liu, J. J., Chan, L. C. And Sung, H. H., (1997). Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Vaccinology, 413–421.

196. Soowannayan, C., Flegel, T.W., Sittigorngul, P., Slater, J., Hyatt, A., Cramerri, S., Wise, T., Crane, M.S.J., Cowley, J.A., McCulloch, R.J., Walker, P.J., (2003). Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. Diseases in Aquatic Organisms, 57, 193-200.

197. Spann, K.M., Vickers. J.E., and Lester, R.J.G., (1995). Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. Diseases in Aquatic Organisms, 23: 127-134.

198. Sritunyalucksana, K., Apisawetakan, S., Boon-nat, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., (2006). A new RNA virus found in black tiger shrimp *Penaeus monodon* from Thailand. Virus Research, 118, 31-38.

199. Sudha, P.M., Mohan, C.V., Shankar, K.M., Hegde, A., (1998). Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. Aquaculture, 167, 95-101.

200. Supamattaya, K., Hoffman, R.W., Boonyaratpalin, S. and Kanchanaphum, P., (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab Portunus pelagicus , mud crab Scylla serrata and krill Acetes sp. Diseases in Aquatic Organisms, 32, 79–85.

201. Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G-I. Yokomizo, Y., (2000). Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of Pantoea agglomerans lipopolysaccharide (LPS). Fish and Shellfish Immunology, 10, 555-558.

202. Tan, L.T., Soon, S., Lee, K.L., Shariff, M., Hassan, M.D., Omar, A.R., (2001). Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricus using competitive polymerase chain reaction. Journal of Fish Disease, 24, 315-323.

203. Tan, Y, Xing Y, Zhang H, Feng Y, Zhou Y, Shi ZL., (2009). Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome

virus in Hainan Province, China, in 2007. Journal of Fish Diseases, 32: 777-784.

204. Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Lightner, D.V., (2003). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. Aquaculture, 216, 19-29.

205. Tang, K.F.J., Lightner, D.V., (2000). Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture, 189, 11-21.

206. Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., Lightnere, D.V., (2005). In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei, L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). Diseases in Aquatic Organisms, 63, 261-265.

207. Tang, K.F.J., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Le Groumellec, M., Duraisamy, P. and Lightner. D.V., (2007). Identification of an iridovirus in *Acetes erythraeus* (Sergestidae) and the development of *in situ* hybridization and PCR method for its detection. Journal of Invertebrate Pathology, 96: 255-260.

208. Tang, X., Wu, J., Sivaraman, J., Hew, C.L., (2007). Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. Journal of Virology, 81, 6709-6717.

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

210. Teunissen, O. S. P., Faber, R., Booms, G. H. R., Latscha, T. And Boon, J. H., (1998). Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture, 164: 359-366.

211. Tsai, J.M., Shiau, L-J., Lee, H-H., Chan, P.W.Y., Lin, C-Y., (2002). Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by multiplex reverse transcription-polyemerase chain reaction (RT-PCR) in pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 50, 9-12.

212. Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Hsiao, H.H., Wang, A.H. & Kou, G.H., (2004). Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. Journal of Virology, 78, 11360–11370.

213. Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Wang, A.H., Zhuang, Y., Walker, P.J., Kou, G.H., Lo, C.F., (2006). Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. Journal of Virology, 80, 3021-29.

214. Umesha, K.R., Dass, B.K.M., Naik, B.M., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., Karunasagar, I., (2006). High prevalence of dual and triple viral infections in black tiger shrimp ponds in India. Aquaculture, 258, 91-96.

215. van de Braak, C. B., Botterblom, M. H., Huisman, E. A., Rombout, J. H. & van der Knaap, W. P. (2002). Preliminary study on haemocyte response to White spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 51, 149-155.

216. vanHulten MC, Reijns M, Vermeesch AM, Zandbergen F, Vlak JM., (2002). Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. Journal of General Virology, 83, 257-265.

217. vanHulten MC, Westenberg M, Goodall SD, Vlak JM., (2000). Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology, 266, 227-36.

218. vanHulten, M.C.W.,Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M., (2001a). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology, 286, 7 –22.

219. vanHulten, M.C.W., Witteveldt, J., Snippe, M., Vlak, J.M., (2001b). White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virology, 285, 228-233.

220. Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T., Chen, J.C., (2006). Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. Letters in Applied Microbiology, 43, 137-142.

221. Venegas, C. A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. And Muroga, K., (2000). Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). Diseases in Aquatic Organisms, 42: 83-89.

222. Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Shimizu, K., Nishizawa, T., Muroga, K., (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. Fish Pathology, 34, 19-23.

223. Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, L.F., Brock, J.A., Salazar, M., (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei*

juveniles infected with white spot syndrome virus. Journal of the World Aquaculture Society, 32, 364-372.

224. Vlak, J.M., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Kou, G.H., Lightner, D.V., Lo, C.F., Loh, P.C. and Walker, P.W. (2005). Nimaviridae. In: Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, eds.), pp. 187–192. Elsevier, Amsterdam.

225. Walker, P.J., and Mohan, C.V., (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. Review in Aquaculture, 1: 125-154.

226. Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J., (2006). Discovery of the Genes in Response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA Microarray. Marine Biotechnology, 8, 491-500.

227. Wang, C. H., Yang, H. N., Tang, C. Y., Lu, C. H., Kou, G. H. and Lo, C. F., (2000). Ultrastructure of White spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. Diseases in Aquatic Organisms, 41, 91-104.

228. Wang, C.H., Lo, C.F., Leu, J.H., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Chou, H.Y., Tung, M.C., Chang, C.F., Su, M.S. and Kou, G.H., (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 23, 239–242.

229. Wang, Q., Nunan, L.M. and Lightner, D.V., (2000a). Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. Diseases in Aquatic Organisms, 43, 175-181.

230. Wang, Q., Poulos, B.T. and Lightner, D.V., (2000b). Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. Archives of Virology, 145, 263–274.

231. Wang, Q., White, B.L., redman, R.M., Lightner, D.V., (1999). Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 170, 179-194.

232. Wang, Y. G., Hassan, M. D., Shariff, M., Zamri, S. M. and Chen, X., (1999). 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 in Aquatic Organisms, 39, 1–11.

233. Wang, Y.C. Lo, C.F. Chang, P.S. and Kou, G.H., (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture, 164:221-231.

234. Wang, Y.G., Lee, K.L., Najiah, M., Shariff, M., Hassan, M.D., (2000). A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. Diseases in Aquatic Organisms, 41, 9-18.

235. WB/NACA/WWF/FAO (2001). "Thematic Review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture" Proceedings of a Workshop held in Cebu, Philippines on 28-30 November 1999. Edited by R. Subasinghe, R. Arthur, M. J. Phillips and M. Reantaso.The World Bank (WB), Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA), World Wildlife Fund (WWF) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion, 135 pp.

236. Witteveldt, J., (2006). On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus., Thesis Wageningen University . ISBN: 90-8504-331-X.

237. Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D., Vlak, J.M., (2005). siRNA injection induces sequence-independent protection in Penaeus monodon against white spot syndrome virus. Virus Research, 114, 133-139.

238. Witteveldt, J. Cifuentes, C. C. Vlak, J. M. and van Hulten, M.C., (2004a.) Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. Journal of Virology, 78:2057-2061.

239. Witteveldt, J. Vlak, J. M. and van Hulten, M.C., (2004b). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish and Shellfish Immunology, 16: 571-579.

240. Witteveldt, J. Vlak, J.M. and van Hulten, M.C., (2006). Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. Diseases of Aquatic Organisms, 70:167-170.

241. Witteveldt, J., Vermeesch, A.M., Langenhof, M., de Lang, A., Vlak, J.M., van Hulten, M.C., (2005). Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. Archives of Virology, 150, 1121-1133.

242. Witvrouw, M. and De Clercq, E., (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. General Pharmacology. 29, 497-511.

243. Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., (2003). Time-course and levels of apotosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus. Diseases in Aquatic Organisms, 55, 3-10.

244. Wongteera supaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajorn, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W., (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Diseases in Aquatic Organisms, 21, 69–77.

245. Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W., (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture, 143, 23-32.

246. Wu W, Wang L, Zhang X., (2005). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. Virology, 332, 578-83.

247. Wu, J. L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T. And Muroga, K., (2002). A timecourse study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology, 13: 391-403.

248. Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. & Muroga, K., (2001). Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in Penaeus japonicus by cannibalism and the waterborne route. Diseases in Aquatic Organisms, 47, 129–135.

249. Wyban, J., (2003). *Penaeus vannamei* seedstock production recent developments in Asia. Global Aquacure Advocate, 78-79

250. Wyban, J.A. and Sweeney, J.n., (1991). Intensive shrimp production technology. High Health Aquaulture Inc. Hawaii. 158 pp.

251. Xiao, N., Zhang, X., Dai, L., Yuan, L., Wang, Y., Zhang, M., Xu, T., Dai, H., (2006). Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody. Journal of Virological Methods, 137, 272-279.

252. Xie, X. and Yang, F., (2006). Wihte spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. Journal of General Virology, 87, 1903-1908.

253. Xie, X., Xu, L., Yang, F., (2006). Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. Journal of Virology, 80, 10615-10623.

254. Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J., Lu, Z., Khan, M.I., (2007). A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 76, 77-80.

255. Xu, J., Han, F., Zhang, X., (2007). Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. Antiviral Research, 73, 126-131.

256. Xu, Z. Du, H. Xu, Y. Sun, J. and Shen, J. (2006). Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms. Aquaculture, 253:179-183.

257. Yang, B, Song, X-L., Huang, J., Shi, C-Y., Liu, Q-H., Liu, L., (2006). A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. Journal of Fish Diseases, 29, 301-305.

258. Yang, F., He, J., Lin, X.H., Li, Q., Pan, D., Zhang, X.B. & Xu, X., (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 75, 11811– 11820.

259. Yang, L-S., Yin, Z-X., Liao, J-X., Huang, X-D., Guo, C-J., Weng, S-P., Chan, S-M., Yu, X-Q., (2007). A toll receptor in shrimp. Molecular Immunology, 44, 1999-2008.

260. Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao L., Qian J., Hu L., (2004). VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in attachment and penetration into shrimp cells. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37, 726-734.

261. Yi, G., Qian, J., Wang, Z., Qi, Y., (2003). A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. Journal of General Virology, 84, 2545-2553.

262. Yoganandhan, K., Musthaq, S.S., Narayanan, R.B., Sahul Hameed, A.S., (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. Journal of Fish Diseases, 27, 517-522.

263. Yoganandhan, K., Narayanan, R.B., Sahul Hameed, A.S., (2003a). Larvae and early post-larvae of *Peaneus monodon* (Fabricus) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. Journal of Fish Diseases, 26, 385-391.

264. Yoganandhan, K., Satish, S., Murugan, V., Narayanan, R.B., Sahul Hameed, A.S., (2003b). Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in Penaeus indicus by histopathology and PCR techniques. Aquaculture, 215, 21-29.

265. You, Z., Nadala, E.C.B. Jr., Yang, J., Van Hulten, M.C.W., Loh, P.C., (2002). Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5 kDa envelope protein of white spot syndrome virus. Diseases in Aquatic Organisms, 51, 77-80.

266. Zhan, W.B., Chen, J., Zhang, Z.D., Zhou, L., Fukuda, H., (2003). Elimination of shrimp endogenous peroxidase background in immunodot blot assays to detect white spot syndrome virus (WSSV). Diseases in Aquatic Organisms, 53, 263-265.

267. Zhang, X., Huang, C., Qin, Q., (2004). Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Peaneus monodon*. Antiviral Research, 61, 93-99.

268. Zhang, X., Huang, C., Xu, X., Hew, C.L., (2002). Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. Journal of General Virology, 83, 1069-74.

269. Zhu, Y., Xie, X., Yang, F., (2005). Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. Virus Research, 113, 100-106.

270. Zhu, Y.B., Li, J.Y., Yang, F., (2006). Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus. Archives of Virology, 151, 71-82.

## Abstract


| | |
|---|---|
| **Surname:** Houshmand | **Name:** Hossein |
| **Title:** Protection of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot disease virus using oral recombinant bioencapsulated VP28 protein | |
| **Supervisors:** Prof. Rahim Peyghan & Prof. Masoudreza Seyfi abad shapouri | |
| **Advisors:** Dr. Jasem Ghafleh Marammazi & Dr. Mohammad Afsharnasab | |
| **Degree:** PhD | **University:** Shahaid Chamran University of Ahvaz |
| **Faculty:** Veterinary Medicine | **Department:** Clinical Sciences |
| **Keywords:** White spot disease virus, *Litopenaeus vannamei*, Recombinant Protein, Bioencapsulation | |

Aquaculture, is perceived as having the greatest potential to meet the growing demand for aquatic food . Crustaceans form one of the main value added components in aquaculture and among them, shrimp aquaculture is the predominant one. Industrial shrimp farming, in combination with poor management in shrimp aquaculture, has quickly led to severe pollution in shrimp ponds, thereby creating a suitable environment for development of bacterial and virus diseases. White spot disease is one of the most deadly diseases that are caused heavy loss in all Penaeid shrimps family.

In Iran during 2002 to 2004 in the Kuzestan province and in 2005 in Bushehr province, the most ponds and farms infected with white spot and the entire industry was facing threat of closure. Owing to the impact of WSSV infection to shrimp aquaculture, there is an urgent need to develop suitable strategies to protect cultured shrimps and make aquaculture more sustainable.

Therefore, this study aimed to examine the possibility of protecting shrimp against white spot syndrome virus using bioencapsulated Artemia with *E. coli* containing the recombinant protein VP28, designed.

Virus genome was extracted from naturally infected *Litopenaeus vannamei* in the choebdeh farms and VP28 gene by designed primers was amplified, extracted, purified and cloned in *E.coli* TG1. Protein expression evaluated and inactivated bacteria containing recombinant protein encapsulated in Artemia nauplii. White shrimp post larvae stage 5 were fed for 5 days with recombinant

nauplii and twice on days 7 and 25 after feeding with Artemia nauplii were challenged with white spot virus. The results of the first experiment revealed that cumulative mortality percent in the group receiving the bacteria containing recombinant plasmid (pMal + VP28) was %14.44±1.11 and the relative percent survival %80.30±1.51. In this group the mortality rates in the various repetitions varied from the 13.33% to 16.66% and relative percent survival of 77.27% to 81.81%. in the Non-recombinant plasmid group (pMal) Mean percent mortality was% 33.33±3.84 and the Relative Percent Survival %54.54±5.24 and in the group that received bacteria contained no recombinant plasmid the Mean cumulative mortality percent was%48.88 ± 5.87 and Relative Percent Survival%33.33± 8.01.

5 days after challenge of the second experiment, in the experimental group containing recombinant plasmid (pMal + VP28) losses start and continued until day 8. In this group cumulative mortality and relative percent survival was %23.33±1.92 and %69.11±2.54 respectively. In the group of non-recombinant bacterial plasmid (pMal) mean percent mortality% 47.77± 2.93 and the average of relative percent survival %36.76±3.89 and finally in the experimental group with no recombinant plasmid the mean losses was %72.22±1.11 and relative percent survival was % 4.41±1.47.

Infection of dissipated shrimp in challenge experiments confirmed by histopathology. Infection of various tissues such as hepatopancreas, gills, stomach, heart and muscles to white spot virus in shrimp were investigated. Vacuolization of hepatopancreas tissue and inclusion bodies were observed in connective tissue of hepatopancreas, muscle, heart and stomach.Our results showed that immunization with VP28 led to lower mortality in comparison with the non-recombinant plasmid groups. This rsult indicates that the recombinant protein can induced more protection.

Since there was a high comulative mortality in non-recombinant bacteria group, we can conclude that, the observed protection may only induced by recombinant membrane protein, and the synergistic effect of bacterial cells expressing the protein had minimal effect.

**Shahid Chamran University of Ahvaz**
**Faculty of Veterinary Medicine**

**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Philosophy (PhD)**
**In: Aquatic Animals Health**

**Subject:**

# Protection of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot disease virus using oral recombinant bioencapsulated VP28 protein

**By:**

**Dr. Hossein Houshmand**

**Under Supervision of:**

**Prof. Rahim Peyghan**

**Prof. Masoudreza Seyfi abad shapouri**

**Advisors:**

**Dr. Jasem Ghafleh Marammazi**

**Dr. Mohammad Afsharnasab**

**June, 2014**

**IN THE NAME OF GOD**

**The thesis by: Dr.** Hossein Houshmand

Entitled: **Protection of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot disease virus using oral recombinant bioencapsulated VP28 protein**

Submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree **PhD in Aquatic Animals Health** has been evaluated and approved on **18 June, 2014 by** thesis committee as **:**

**thesis committee**

**Prof. Rahim Peyghan, professor of Fish Health and Diseases (**Supervisor**)**

**Prof. Masoudreza Seyfi abad shapouri, professor of Microbiology (**Supervisor**)**

**Dr. Jasem Ghafleh Marammazi, Associate professor of Aquaculture** (**Advisor)**

**Dr. Mohammad Afsharnasab, Associate professor of Fish Health and Diseases** (**Advisor)**

**Dr. Mehrzad Mesbah, Associate professor of Fish Health and Diseases (Referee)**

**Dr. Babak Mohammadian, Associate professor of Pathology (Referee**)

**Dr.Abbas Jelodar, Associate professor of Molecular Genetic (Referee**)

**Dr. Hossein zolqarnain, Assistant professor of Molecular Genetic (Referee)**