

**Original Research Paper****Comparative Histologic Changes in shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to attenuated WSSV vaccine produced by Gamma irradiation with unvaccinated shrimps**

Damon Boreyri¹, Mohammad Afshar nasab^{1*}, Abbasali Motallebi Moghanjoghi², Adel Haghighi Khiabani Asl¹

¹Department of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Food Hygiene, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

Shrimp
White spot virus
Vaccine
Gamma ray
Tissue

Abstract

Introduction: Regarding to white spot syndrome extent and threat of shrimp culture, preventive measures such as efficient vaccine production is necessity. So, this study was done to evaluate of histologic changes in shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to attenuated WSSV vaccine produced with unvaccinated shrimps.

Materials & Methods: 360 shrimp without white spot disease was divided in four groups of 90th with an average weight of 1.0± 0.1 gr were collected and transferred to the shrimp research institute. The *L. vannamei* virus was selected and exposed to doses of 14-15k Gy per seconds to gamma rays and the inactivated virus was produced as an attenuated vaccine. The selected shrimps were divided to vaccinated and then encountered to virus (T₁), exclusively vaccinated (T₂), positive control (infected with white spot virus) (C+) and unvaccinated and not encountered with virus as negative control (C-) groups. T₁ and T₂ groups were initially vaccinated for 7 days and from eighth day, T₁ and C+ groups were exposed to white spot virus then for 14 days shrimps were kept in separated tanks. Shrimps were fixed by Davidson solution for histologic study then dehydration, wax infiltration and impregnation were done by tissue processor and stained by Haematoxylin & Eosin/phloxine. Histologic changes were seen by optical microscope.

Results: The most inclusion body were seen in gill, hepatopancreas, lymphocytes, muscular cells.

Conclusion: The attenuated virus with gamma ray seems significantly to reduce the mortality rate in shrimps which it can be used as an appropriate method to control white spot disease.

* Corresponding Author's email: m1afsharnasab@gmail.com

Received: 8 May 2021; Reviewed: 10 June 2021; Revised: 13 August 2021; Accepted: 3 September 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.283639.2603

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای تغییرات بافتی در میگوی وانامی واکسینه شده با واکسن تخفیف حدت یافته بیماری لکه سفید تهیه شده با اشعه گاما با میگوهای غیر واکسینه

دامون بریری^۱، محمد افشارنسب^{۱*}، عباسعلی مطلبی مغانجوقی^۲، عادل حقیقی خیابانیان اصل^۱

^۱ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

میگو
 ویروس لکه سفید
 واکسن
 اشعه گاما
 بافت

مقدمه: نظر به گسترده‌ی بیماری لکه سفید و تهدید صنعت میگو، لزوم به‌کارگیری تمهیدات پیشگیرانه از قبیل تولید واکسن‌های کارآمد احساس می‌گردد. لذا این مطالعه به‌منظور ارزیابی تغییرات بافت‌شناسی میگوهای واکسینه با واکسن بیماری لکه سفید تخفیف حدت یافته در مقایسه با میگوهای غیر واکسینه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۶۰ میگو در چهار گروه ۹۰ تایی با میانگین وزن 17 ± 0.1 گرم انتخاب و به پژوهشکده میگوی کشور منتقل گردیدند. ویروس با دز ۱۵-۱۴ کیلوگری در ثانیه با اشعه گاما مواجهه و به‌عنوان واکسن تخفیف حدت یافته استفاده گردید. چهار گروه میگو شامل در معرض قرار گرفته (T₁)، صرفاً واکسینه (T₂)، کنترل مثبت (آلوده به ویروس لکه سفید) (C⁺) و غیرواکسینه و غیرمواجهه با ویروس به‌عنوان کنترل منفی (C⁻) تقسیم‌بندی شدند. ابتدا به‌مدت ۷ روز گروه‌های T₁ و T₂ واکسینه و از روز ۸ گروه‌های میگو T₁ و C⁺ با ویروس لکه سفید مواجهه و به‌مدت ۱۴ روز میگوها در تانک‌های جداگانه نگهداری شدند. جهت مطالعات بافتی میگوها با محلول داویدسون فیکس و رنگ‌آمیزی با استفاده رنگ هماتوکسیلین و ائوزین/فلوکسین انجام شد.

نتایج: بیش‌ترین کنجیدگی‌های داخل سلولی از گروه کنترل مثبت و در بافت‌های آبشش، هپاتوپانکراس، سلول‌های لنفاوی و بافت عضلانی مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: ویروس تخفیف‌حدت یافته در طی آزمایش، میزان مرگ و میر در میگوها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب در کنترل بیماری لکه سفید مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

و بوشهر به ۳۶۰ میلیارد تومان رسید (۶). باتوجه به اهمیت این ویروس و کنترل بیماری ناشی از آن، روش‌های متعددی به منظور غیرفعال سازی خاصیت عفونت‌زایی ویروس‌ها استفاده شده است که شامل استفاده از مواد شیمیایی که با تغییر در ساختار ویروس سبب غیرفعال سازی DNA و RNA می‌شوند، شوک‌های حرارتی و هم‌چنین استفاده از پرتوهای یون‌ساز می‌باشند (۷). در ایران تولید واکسن زنده تخفیف حدت یافته بیماری لکه سفید، جهت پیشگیری با استفاده از روش‌های هسته‌ای و غیرهسته‌ای در میگوی سفید هندی توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران به انجام رسید و مشخص گردید که ویروس لکه سفید پرتو داده شده با سه روش اشعه گاما، بیم‌الکترون و فرمالین دارای اثرات متفاوت بوده و بهترین تاثیر واکسن تهیه شده را می‌توان در پرتوهای تابیده شده به روش گاما مشاهده نمود (۸). پرتودهی با اشعه گاما به‌عنوان روشی مطمئن و ایمن مطرح است. پرتو گاما با داشتن ویژگی‌هایی مانند نفوذپذیری بسیار بالا که می‌تواند برخلاف الکترون در مواد با تراکم بالا و هم‌چنین غیرهم‌جنس به‌خوبی نفوذ کند و هیچ‌گونه باقی‌مانده‌ای پس از پرتوتابی باقی نگذاشته و کم‌ترین تغییر را در خاصیت آنتی‌ژنتیکی برخلاف مواد شیمیایی ایجاد می‌کند، دارای کاربرد وسیع است. ویروس تب برفکی، ویروس روبلای عامل سرخک، پیکورنا ویروس‌ها و ویروس لوکمی از جمله ویروس‌هایی هستند که با روش پرتودهی با اشعه گاما غیرفعال شده‌اند (۹). از همین‌رو با توجه به گستردگی بیماری لکه سفید و تهدیدی که برای صنعت میگو ایجاد نموده است، لزوم به‌کارگیری تمهیدات پیشگیرانه از قبیل تولید واکسن‌های مناسب و کارآمد به‌خوبی حس می‌گردد. در این تحقیق تغییرات بافتی میگوهای وانامی واکسینه شده با واکسن تخفیف حدت یافته بیماری لکه سفید تهیه شده با اشعه گاما با میگوهای غیرواکسینه شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

واکسن مورد استفاده در این مطالعه، ویروس تخفیف حدت یافته عامل بیماری لکه سفید بود که غیرفعال سازی آن با اشعه گاما با دز ۱۵ کیلوگری و غلظت کشنده $LD_{50}/ml = 10^{5.4}$ انجام گرفت. این واکسن در پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی ایران و موسسه تحقیقات شیلات ایران تهیه گردید. تعداد ۳۶۰ میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزن 1 ± 0.17 گرم از مزرعه تحت قرنطینه جمع‌آوری شدند و به مرکز تحقیقات میگوی ایران واقع در استان بوشهر جهت انجام آزمایشات به مدت ۱۴ روز انتقال یافتند. جهت حصول اطمینان از این‌که میگوهای سالم مورد استفاده قرار می‌گیرند، میگوها از نظر عدم وجود هرگونه بیماری از

در سال‌های اخیر بارش دروزافزون جمعیت انسانی، تکثیر و پرورش آبزیان در جهان اهمیت فزاینده‌ای یافته است. امروزه تکثیر و پرورش میگو جایگاه ویژه‌ای در صنعت و حتی سیاست یافته و به‌صورت یک صنعت پررونق درآمده است به‌طوری‌که در دنیا، تکثیر و پرورش آبزیان با رشد سالانه ۶/۳ درصدی از ۳۴/۶ میلیون تن در سال ۲۰۰۱ به ۵۹/۹ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ رسید (۱). آغاز پرورش میگو در جهان به حدود یک‌صد سال قبل و کشورهای شرق و جنوب شرق آسیا مانند تایلند، ویتنام، فیلیپین، چین و ژاپن باز می‌گردد. هم‌اکنون تکثیر و پرورش میگو در همه کشورهای آسیایی و کشورهای آمریکای جنوبی از قبیل اکوادور، برزیل، پرو و مکزیک به‌طور وسیعی گسترش یافته است. کشور ایران با داشتن ۱۸۰۰ کیلومتر نوار ساحلی در جنوب و هم‌چنین وجود زمین‌های لم یزرع در سواحل خلیج فارس و دریای عمان از پتانسیل بالایی در زمینه آبرزی پروری ساحلی برخوردار است. در ایران از سال ۱۳۶۴ مطالعات و تحقیقات در زمینه پرورش میگو برای نخستین بار انجام شد و اولین مرکز تکثیر و پرورش میگو در ایران در روستای کلاهی از توابع شهرستان میناب در سال ۱۳۷۱ توسط سازمان شیلات ایران به‌عنوان متولی اصلی توسعه آبرزی پروری در کشور جهت استفاده از پتانسیل یادشده آغاز به کار نمود (۲، ۳). با توسعه خیره‌کننده صنعت و بهره‌گیری از فن‌آوری‌های روز دنیا، امکان بهره‌برداری و افزایش راندمان تولید در مزارع پرورش میگو به‌میزان قابل توجهی بالا رفته است ولی به موازات افزایش بهره‌وری، تراکم بالا و شرایط پرورش مصنوعی موجب شده که بروز بیماری‌ها به‌عنوان مشکلی مهم، همواره تهدیدکننده حیات اقتصادی و پایداری درازمدت صنعت پرورش میگو باشد به‌طوری‌که امروزه بیماری‌ها به‌عنوان مهم‌ترین چالش پیش روی صنعت میگو در جهان می‌باشند. در این میان، بیماری لکه سفید از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردار است (۴). نخستین گزارش بیماری لکه سفید میگو در سال ۱۹۹۱ در تایوان بود که در میگوهای خانواده پنائیده سندرمی به‌نام لکه سفید، سایر بیماری‌های شناخته شده میگو تا آن زمان را تحت‌الشعاع خود قرار داد. این بیماری باعث از بین رفتن تعداد زیادی میگو با ارزش میلیون‌ها دلار در مزارع پرورش بسیاری از کشورها نظیر چین، ژاپن، هند، تایلند، اندونزی، سریلانکا، بنگلادش و مالزی طی سال‌های ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ میلادی گردید (۵). در ایران در تابستان سال ۱۳۸۱ گزارشی از مرگ و میر شدید در میگوهای منطقه چوئیده آبادان واصل گردید. پس از انجام تحقیقات ویروس‌شناسی و میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که میگوهای منطقه مبتلا به بیماری لکه سفید بودند علاوه بر آن برآورد خسارت ناشی از این بیماری طی سال‌های ۲۰۰۴ الی ۲۰۰۸ میلادی تنها در دو استان خوزستان

ثابت کردن با محلول داویدسون در ارتباط با لاروها و

پست لاروهای اولیه: در این تحقیق از فیکساتور داویدسون استفاده شد. این فیکساتور RNA ویروس ها را فیکس نکرده و موجب تخریب RNA می گردد. لاروها و پست لاروها به طور مستقیم در محلول فیکس کننده به مدت ۲۴-۱۲ ساعت نگهداری شده و سپس آن ها را به الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل و در محیط آزمایشگاه نگهداری شد.

ثابت کردن با محلول دیویدسون در ارتباط با پست لاروهای

بزرگ، نوجوان ها و بالغ ها: در ارتباط با پست لاروهای بزرگ نوجوان ها و بالغ ها باید ابتدا فیکساتور را در هیپاتوپانکراس و سپس در قسمت های واقع در دو طرف بند سوم و بند ششم تزریق نموده و بعد به وسیله یک قیچی از عرض بند ششم بدن تا وسط قسمت سرسینه و در نهایت تا انتهای سر و نزدیک روستروم و پشت پایک چشمی برش داده شد. برای نمونه های خیلی بزرگ یک شکاف عمیق در حد فاصل بدن و سر، در محل اتصال آن ها و به صورت عرضی ایجاد شد این برش ها سبب می شود که ماده فیکساتور به خوبی در سلول ها نفوذ کرده و بعد از ایجاد برش ها میگو را در ماده فیکساتور قرار داده شد. حجم فیکساتوری که نمونه ها در آن قرار داده شد به نسبت ۱۰ برابر حجم میگوها یا بافتی از میگو بود که به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر حسب اندازه میگوها در محلول فیکساتور قرار داده شدند. نمونه ها را سپس به الکل ۷۰-۵۰ درصد منتقل نموده و در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداری شد. نمونه های نگهداری شده در الکل در حوله خشک شد و سپس در پلاستیک های نفوذناپذیر قرار داده شد (۱۰).

برش بافت ها: بعد از فیکس کردن، برش بافتی انجام شد. برای

این که بافت ها دچار صدمه یا خراشی نشوند، از قیچی یا تیغی تیز استفاده شد. اگر اندازه میگوها کمتر از ۳ سانتی متر بود، به صورت طولی و از قسمت بیرونی به طرف میانی برش داده شد.

آماده کردن بافت ها (Processing) و آبیگری: عمل آبیگری

از بافت ها به آرامی با گذاشتن آن ها در الکل با غلظت های پائین و سپس رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد انجام شد. اگر یک باره بافت را در الکل ۱۰۰ درصد قرار داده می شد، موجب تخریب بافت ها می گردید. بعد از آبیگری بافت را با یک ماده حل کننده الکل مثل زایلن شستشو داده تا الکل از بافت ها خارج شود و عمل نفوذ پارافین در بافت به طور کامل انجام شود. عملیات آبیگری به ترتیب ذیل بود: الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)، الکل ۸۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)، الکل ۹۵ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)، الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت (۲ بار)، زایلین یا سایر مواد پاک کننده به مدت ۱ ساعت (۲ بار) و سپس پارافین به مدت ۱ ساعت (۲ بار) بر روی بافت ها انجام گرفت.

قبل بر پایه لیست پاتوزن های ویروسی سازمان جهانی سلامت حیوانات (OIE) شامل WSSV, TSV, IHNV, IMNV, HPV و YHD با استفاده از کیت آزمایشگاهی IQ2000 TM Nested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند (Gene Research Biotechnology Corp., Taiwan). میگوها در تانک های فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با آب دریا کلرزدایی شده و هوادهی با جریان نیم لیتر در ثانیه نگهداری می شدند. جهت حصول اطمینان از صحت نتایج، کلیه پارامترهای محیطی از قبیل دما، شوری، نوردهی و سایر پارامترها کنترل شده و برای تمامی تانک ها یکسان بود. دمای آب 27 ± 1 سانتی گراد، اکسیژن محلول ۵/۵ تا ۵ قسمت در میلیون، pH ۷/۸ تا ۷/۵، درجه شوری $28 \pm 1/0$ قسمت در ترلیون و نوردهی به صورت نور مصنوعی و یکسان برای تمام گروه ها به مدت ۷ روز آزمایش بود. غذادهی نیز با پلت های تجاری و هم چنین با آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) سه بار در روز انجام گرفت. میگوهای سالم عاری از WSSV به چهار تیمار تقسیم شدند و هر تیمار به طور مجزا از یکدیگر نگهداری گردیدند تا از بروز عفونت متقاطع جلوگیری به عمل آید. اعضای هر تیمار نیز در سه تانک مجزا قرار گرفتند. شمارش میزان مرگ و میر، دو بار در روز انجام می گرفت (صبح و شب) و میگوهای مرده به جهت آزمایش وجود عامل بیماری لکه سفید با کیت Nested-PCR آزمایش گردیدند. گروه اول یا T1 به عنوان تیمار اول شامل میگوهای بود که هم واکسن دریافت کرده بودند و هم با ویروس مواجه شده بودند. گروه دوم یا T2، شامل میگوهای بود که واکسن دریافت کرده بودند ولی هیچ گونه مواجهتی با ویروس عامل بیماری لکه سفید نداشتند. تزریق واکسن در گروه های تیمار اول و تیمار دوم به صورت داخل عضلانی در فضای واقع در بین قسمت های چهارم و پنجم شکمی بود. میزان واکسن تزریقی ۴ میکروگرم در روز اول بوده و سپس در گروه تیمار اول ۷ روز نگهداری و پس از آن مواجهه با ویروس عامل بیماری لکه سفید صورت گرفت. گروه سوم یا کنترل مثبت شامل میگوهای بود که واکسن نخورده بودند ولی با ویروس عامل بیماری لکه سفید مواجهه داشتند. گروه چهارم یا کنترل منفی شامل میگوهای بودند که نه واکسن دریافت کرده بودند و نه با ویروس عامل بیماری لکه سفید مواجه شدند. بدیهی است پس از ۵ تا ۱۰ روز نسبت به نمونه برداری هیستوپاتولوژی در همه گروه ها اقدام گردید. به منظور جلوگیری از تغییرات بعد از مرگ و ضربه های وارد شده به میگو، بلافاصله بعد از خارج شدن از آب فیکس گردیدند بدین گونه که پس از نمونه برداری با استفاده از فیکساتور اندام های میگو فیکس شده و بافت های داخلی همانند هیپاتوپانکراس و عضلات با سرنگ انسولین تزریق فیکساتور صورت گرفت.

تهیه بلوک از بافت‌ها با پارافین (Embedding): بعد از آماده

کردن بافت‌ها شامل عملیات آگیری، نفوذ پارافین و عمل تخلیه هوا، در دستگاه عمل‌آوری بافت به‌طور کامل انجام گردید. بافت‌ها را به صورت قالب‌های پارافینی درآورده شدند و عمل تخلیه هوا با دستگاه پمپ خلع به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. عملیات قالب‌گیری نیز در دستگاه پلِت سرد و گرم (Hot Plate and Cold Plate) که دارای سینی سرد و سینی گرم است انجام و برش بافتی با میکروتوم به ضخامت ۳-۶ میکرون صورت گرفت.

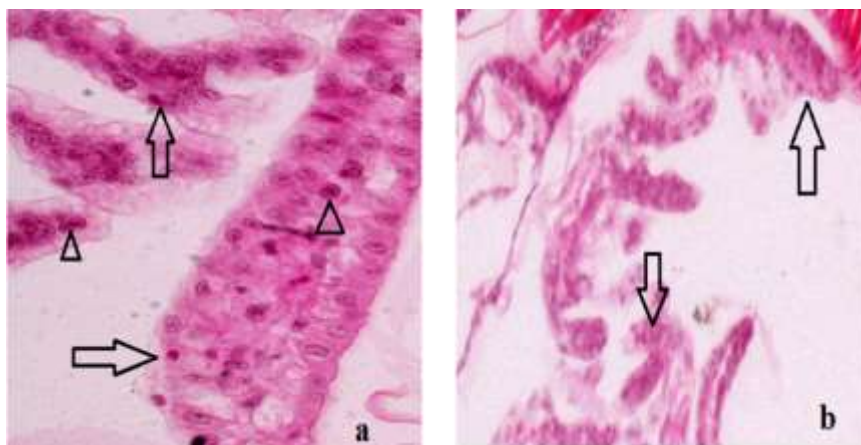
عملیات رنگ‌آمیزی (Staining): پیش از رنگ‌آمیزی، قالب‌های

پارافینی باید از پارافین پاک شده و سپس آگیری شوند. جهت جدا سازی پارافین از برش‌های تهیه شده، لام مقاطع تهیه شد و آن‌ها روی یک حوله کاغذی در یک آون یا کوره با حرارت ۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در این حالت پارافین آب شده و جذب حوله کاغذی گردیده و مقاطع جهت آگیری آماده گردیدند. بعضی از مقاطع تهیه شده شبیه گسترش تهیه شده از همولنف یا لام مرطوب با پارافین قالب‌گیری نمی‌شوند، لذا باید این گسترش‌ها را در هوا خشک نموده و دیگر نیازی به آگیری ندارند. به منظور ساختن لام‌های دائمی، عملیات آگیری انجام و لام‌ها را با مواد ضدآب پوشانده شد. برای مطالعه بافت‌های میگو در آسیب‌شناسی، بهترین رنگ مورد استفاده رنگ همتوکسیلین و ائوزین/فلوکسین بود. عمل مشاهده با میکروسکوپ بهتر است بعد از ۲۴ ساعت انجام گیرد تا لامل کاملاً روی لام چسبیده و خشک شود. موضوع مهمی که باید به آن اشاره شود این است که هنگامی که برش‌های بافتی تهیه می‌شود اندازه بافت‌ها و برش‌ها باید خیلی نازک باشد و در ابعاد مختلف از آن‌ها برش تهیه شود تا بیان‌کننده آناتومی کل بدن میگوها باشد.

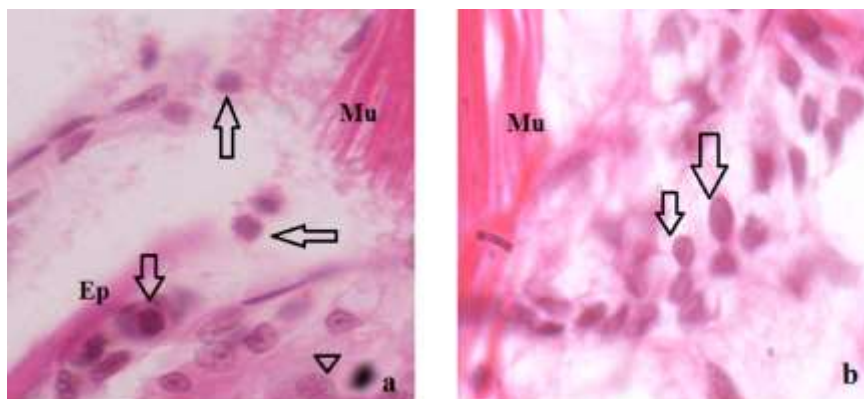
نتایج

براساس نتایج، ویروس لکه سفید در تیمارهای T₁، T₂ و C⁺ به صورت حاد بروز کرد ولی در کنترل منفی اثری از ویروس مشاهده نگردید. میزان مرگ و میر تجمعی در تیمار ۱ (T₁) از روز پنجم شروع و حداکثر تلفات به ۱۶ درصد در روز یازدهم رسید. میزان مرگ و میر تجمعی در این تیمار ۵۰ درصد بعد از ده روز دوره آزمایش بود و ثابت باقی ماند. در حالی که میزان مرگ و میر تجمعی در کنترل مثبت از روز دوم آغاز و بعد از هفت روز به ۱۰۰ درصد رسیده و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با گروه تیمار ۱ (P<۰/۰۵) داشت. در

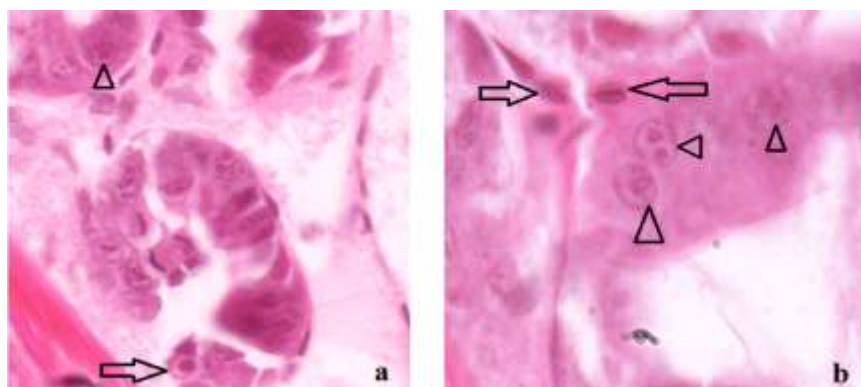
تیمار ۲ که فقط با واکسن مواجهه داده شده بودند هیچ تلفاتی تا روز پنجم مشاهده نشد. میزان تلفات از روز سوم به ۳ درصد و حداکثر مرگ و میر به ۹ درصد در روز نهم رسیده و مرگ و میر تجمعی در پایان دوره آزمایش به ۹ درصد رسید. همانند تیمار اول، درصد مرگ و میر روند آرام‌تری نسبت به گروه کنترل مثبت (تیمار ۳) داشت و مشابه گروه کنترل منفی (تیمار ۴) کم‌تر از گروه‌های تیمار ۱ و تیمار ۳ بوده است. مرگ و میر تجمعی در گروه تیمار ۴، تا پایان آزمایش تنها ۳ درصد بود. تغییرات بعد از مرگ میگو شامل گرد و لایه‌لایه شدن سلول‌ها به‌خصوص سلول‌های هپاتوپانکراس بود. به‌طور کلی هر چه زمان فیکس شدن نمونه‌ها بعد از مرگ طولانی‌تر باشد تغییرات سلول‌ها بیش‌تر خواهد بود. هر یک از نمونه‌ها قبل از ثابت شدن در حداقل استرس جابه‌جایی قرار گرفتند. آسیب‌شناسی بافتی متأثر از استرس ناشی از دستکاری بیش‌از حد، کمبود اکسیژن و غیره می‌توانست موجب استنباط غیر صحیح از وضع جانور نسبت به محیط طبیعی آن گردد. در بررسی بافت‌های مختلف میگوهای مورد آزمایش، آلودگی شدید میگوهای مواجهه داده شده در برابر ویروس لکه سفید، کنجیدگی‌های داخل هسته‌ای بازوفیلیک را نشان داد. این آلودگی‌ها در گروه میگوهای کنترل مثبت بیش‌تر از سایر گروه‌ها بوده و در میگوهای کنترل منفی آلودگی مشاهده نگردید. براساس مشاهدات بیش‌ترین کنجیدگی‌های داخل سلولی از گروه کنترل مثبت و در بافت‌های آبشش، هپاتوپانکراس، سلول‌های لنفاوی و بافت عضلانی و مجاری بین لوب‌های هپاتوپانکراس مشاهده گردید. در بافت آبشش کنجیدگی‌های بازوفیلیک نشان‌دهنده آلودگی شدید میگوها به ویروس لکه سفید بود (شکل ۱). با توجه به کوچک بودن میگوها اندازه کنجیدگی‌ها به نسبت این کنجیدگی‌ها در بافت میگوهای بزرگ کوچک‌تر مشاهده شد. در بافت اپیتلیوم و بافت عضلانی نیز حضور کنجیدگی‌های داخل سلولی (شکل ۲) آلودگی به ویروس لکه سفید را نشان داد. بافت هپاتوپانکراس علی‌رغم عدم حضور کنجیدگی‌های داخل هسته‌ای، وجود کنجیگی در سلول‌های هپاتوپانکراس (شکل ۳) و بافت بینابینی مشخص بود. یکی از بافت‌هایی که به ویروس مقاومت نشان داده و آلودگی در آن مشاهده نگردید بافت چشم‌های مرکب میگوها بود (شکل ۴). بافت لنفاوی نیز آلودگی با ویروس سلول‌های لنفاوی را آلوده و کنجیدگی‌های داخل سلولی در آن‌ها مشخص است (شکل ۵).



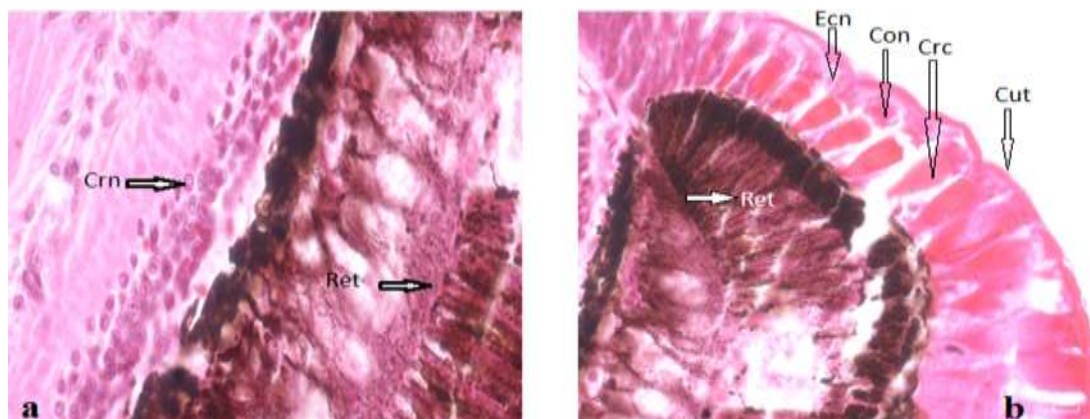
شکل ۱: بافت آبشش میگوهای آلوده در تیمار کنترل مثبت (a) و گروه میگوهای واکسن زده و مواجهه داده شده (b)، پیکان مشخص کننده حضور کنجیدگی‌های داخل هسته‌ای بازوفیلیک در رشته‌های اولیه و ثانویه آبشش می‌باشد. هم‌چنین سلول‌های هیپرتروفی که آلوده به ویروس می‌باشند در همه گروه‌های میگو به استثنای گروه کنترل منفی مشخص بود (مثلت). H&E/Ph, Mag: 1000X.



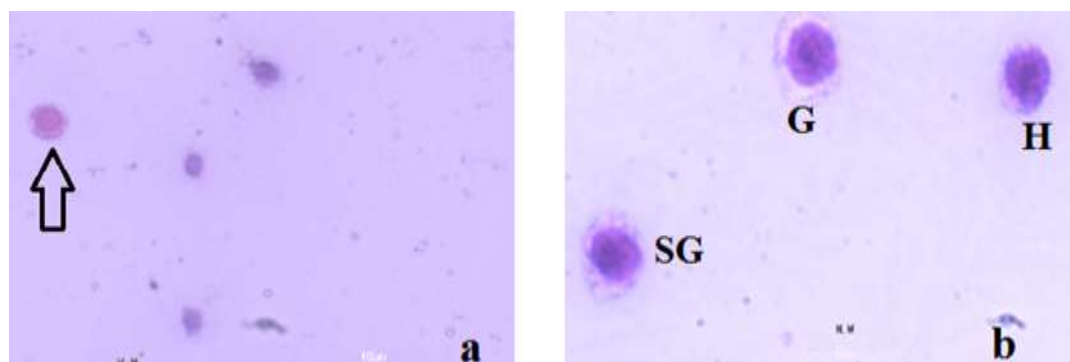
شکل ۲: بافت عضلانی (Mu) و اپیتلیوم (Ep) میگوهای مواجهه شده با واکسن (a) و کنترل مثبت (b). در تصویر a در بافت اپیتلیوم که از بافت‌های حساس به ویروس لکه سفید کنجیدگی داخل هسته‌ای بازوفیلیک مشاهده می‌شود (پیکان)، هم‌چنین حالت کاربوریکی (مثلت) که از مراحل اولیه در تشکیل کنجیدگی است و هسته تکه تکه می‌شود مشخص است. H&E/Ph, Mag: 1000X.



شکل ۳: بافت هپاتوپانکراس میگوهای مواجهه شده با واکسن (a) و کنترل مثبت (b). نشان‌دهنده کنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در تصویر a با پیکان مشخص شده است. هم‌چنین هسته هیپرتروفی شده (مثلت) در تصاویر دیده می‌شود. در تصویر b کنجیدگی‌های زیاد داخل سلولی (پیکان) را در بین لوب‌های بافت هپاتوپانکراس و بافت بین سلولی نشان می‌دهد. هم‌چنین در تصویر b بزرگ شدن و تکه‌تکه شدن (Fragmentation) هسته سلول‌ها مشخص است. H&E/Ph, Mag: 1000X.



شکل ۴: بافت چشم‌های مرکب میگوهای مواجهه شده با ویروس (a) و واکسن (b) که نشان می‌دهد آلودگی و کنجیدگی‌های داخل سلولی در بافت مشاهده نمی‌گردد. کوتیکول (Cut) که در زیر آن سلول‌های مخروطی شکل (Con) و هسته سلول‌های مخروطی (Ecn) دیده شده و در زیر آن‌ها سلول‌های کریستالی چشم (Crc) دیده شده که فاقد کنجیدگی می‌باشند. همچنین سلول‌های قشری (Crn) و سلول‌های شبکه چشم (Ret) فاقد هرگونه کنجیدگی بود. H&E/Ph, Mag: 1000X.



شکل ۵: سلول‌های لنفاوی که در تصویر a (مواجهه با واکسن) آلودگی با ویروس و کنجیدگی را نشان می‌دهد (پیکان) و در تصویر b سلول‌های مختلف لنفاوی شامل گرانولوسیت (G)، سمی گرانولوسیت (SG) و سلول‌های هیالین (H) را نشان می‌دهد که در تصویر a بسیار کم‌تر می‌باشد. Kondo Staining, Bar: 50µm

بحث

شروع و تا مرحله آخر آزمایش در روز ۱۴ میزان بقا میگوها ۵۰ درصد بوده، این در حالی است که در تیمار کنترل مثبت که میگوها فقط با ویروس مواجه شدند حداکثر تلفات در روز ۷ بعد از مواجهه‌سازی مشاهده گردید و از روز ۸ بعد از مواجهه‌سازی کلیه میگوهای تیمار کنترل مثبت از بین رفتند. در نتایج Witteveldt و همکاران، میگوها برای ۲۰ روز مقاومت نشان دادند و میزان بازماندگی در نهایت به صفر رسید ولی در این تحقیق بعد از ۱۴ روز مواجهه‌سازی میزان بقا میگوها به ۵۰ درصد رسید و این اختلاف ممکن است ناشی از نوع واکسن یا دوز واکسن تزریقی باشد (۱۲). در مطالعه حاضر دوز ویروس تزریقی به ۱ گرم میگو ۱۱۵ واکسن حاوی ۱۰^۵ تا ۱۰^۶ پارسیکل ویروسی در محلول PBS بوده و نوع ویروس تخفیف حدت یافته بوده و توانسته بود در مدت ۱۴ روز بقای ۵۰ درصد را ایجاد نماید درحالی که در

مطالعات متعددی درجهان به‌خصوص در دهه گذشته در زمینه تولید واکسن بهینه علیه بیماری ناشی از ویروس لکه سفید در میگو انجام شده است که مهم‌ترین واکسن با ایمنی‌زایی بالا در ارتباط با پروتئین‌های ویروسی بوده است گرچه در ارتباط با واکسن تخفیف حدت یافته با استفاده از فرمالین، اتیلن ایمین دوتایی و اشعه گاما مطالعات مختلفی انجام شده است که ایمنی‌زایی آن‌ها باهم متفاوت بوده است ولی این روش‌ها نیز تا ۱۰۰ درصد ایمنی‌زایی بعد از استفاده از خود نشان دادند (۱۱). در مطالعه حاضر با استفاده از پرتوهای گاما، ویروس لکه سفید تخفیف حدت یافته به‌عنوان واکسن در میگوهای یک گرمی استفاده شد که بعد از ۷ روز واکسیناسیون میگوها در تیمار T₁، آن‌ها را با ویروس لکه سفید مواجهه داده شدند. مرگ میگوها از روز پنجم

مطالعه Witteveldt و همکاران نوع واکسن از نوع واکسن‌های نو ترکیب از پروتئین VP₁₉ بوده است که توانسته فقط مرگ و میر را به مدت ۱۰ روز تاخیر اندازد (۱۲). هم‌چنین میگوی مورد استفاده در آن آزمایش میگوی ببری سیاه بوده درحالی‌که میگوی مورد استفاده در مطالعه حاضر میگوی سفید غربی (وانامی) بود. برخی از خصوصیات ایمنی از جمله اینترفرون (IFN) که در مهره‌داران نقش مهمی در کنترل ویروس‌ها دارد، در بی‌مهرگان نیز به اثبات رسیده است و این فاکتور در میگوی سفید غربی بیش‌تر از سایر میگوها از جمله میگوی ببری سیاه می‌باشد (۱۳) و شاید یکی از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیق سایر محققین در نوع میگوی مورد استفاده در این آزمایش باشد. هم‌چنین این احتمال وجود دارد که تاخیر در مرگ و میر و بقای پنجاه درصدی ناشی از ایجاد فاکتورهای ضد ویروسی در بدن میگوهای مورد آزمایش بوده یا این‌که استفاده از این واکسن موجب مهار رسپتورهای گیرنده ویروس در سطح سلول‌های حساس میگو گردیده و از این طریق از ورود ویروس به داخل سلول‌ها جلوگیری شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که دوره‌ای که ویروس لکه سفید در میگوها ایجاد مرگ و میر می‌کنند بین روزهای سوم تا هفتم آلودگی می‌باشد و در روز هفتم به حداکثر می‌رسد. با این حال در این مطالعه حداکثر تلفات در گروه کنترل مثبت ۷ روز بعد از مواجهه‌سازی اتفاق افتاد و هیچ میگوئی باقی نماند. یکی از دلایل این موضوع شاید به دلیل بالا بودن دوز ویروس تزریقی و یا سویه ویروس مورد استفاده بوده است. سویه ویروس مورد استفاده از سویه ویروس جدا شده از چابهار بوده که در مقایسه با سویه‌های جدا شده از بوشهر و خوزستان از حدت بالاتری برخوردار می‌باشد (۱۰). هم‌چنین حساسیت مراحل لاروی میگو در مقایسه با سن میگوهای مورد استفاده در سایر تحقیقات نیز شاید از دلایل دیگر مرگ و میر بالا در این تحقیق بوده باشد زیرا در میگوهای که سن آن‌ها بالاست فعالیت سلول‌هایی که در مقابل ویروس‌ها فعالیت بالاتری را نشان می‌دهند گزارش شده است (۱۴). در مطالعه حاضر در تیمار T₂ که فقط واکسن تزریق می‌شود نیز میزان بقا ۹۱ درصد بود و ۹ درصد میگوها تلف شدند. مرگ و میر میگوها در تیمار T₂ می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد. یکی از دلایل شاید به خاطر استرسی است که در تزریق واکسن به میگوها ایجاد شده و براساس دستکاری، میگوها ضعیف شده و از طرفی حضور واکسن نیز خود موجب تضعیف میگوها و مرگ و میر در گروه تیمار T₂ شده باشد. به هر حال این موضوع به کیفیت واکسن برمی‌گردد که نیاز به بررسی کامل‌تر بر روی واکسن و شرایط واکسیناسیون دارد. براساس مطالعات صورت گرفته پروتئین‌های مختلفی در ژنوم ویروس لکه سفید در ایجاد بیماری نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از VP₂₈، VP₁₉ و VP₃₃₆ (۱۵). با این حال این‌که اشعه گاما مورد استفاده

کدام یک از پروتئین‌ها و یا چه بخشی از آن را غیرفعال نموده نیاز به بررسی وضعیت پروتئین‌ها بعد از پرتوتابی دارد. در این ارتباط با توجه به این‌که در پرایمرهای تولیدی در کیت‌های تشخیصی بخشی از پروتئین‌های ایجاد کننده بیماری مورد استفاده قرار گرفته و تکثیر می‌شود، وجود باندهای مثبت در میگوهای واکسینه ناشی از این است که بخشی از پرایمرها می‌توانند تکثیر یابند که آسیب ندیده و در نمونه‌ها به صورت مثبت مشاهده می‌گردند ولی میزان مرگ و میر در این نمونه‌ها در مقایسه با کنترل مثبت کاهش معنی‌داری داشت. مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌های میگوهای آلوده با ویروس و مواجهه شده با واکسن در مقایسه با گروه کنترل منفی حاکی از وجود کنجیدگی‌های داخل سلولی در بافت‌های مورد مطالعه می‌باشد. در گزارشات آسیب‌شناسی بافت‌های هپاتوپانکراس میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید وجود واکوئل در سلول‌های هپاتوپانکراس مشخص بوده است ولی در مطالعه حاضر آثاری از واکوئل در سلول‌های هپاتوپانکراس نبود هم‌چنین در گزارشات مختلف وجود این کنجیدگی‌ها در بینابین لوپول‌های سلول‌های هپاتوپانکراس گزارش گردیده است ولی در این مطالعه در داخل سلول‌ها نیز کنجیدگی مشاهده گردید (۱۶). با توجه به مراحل نوزادی میگوهای مورد مطالعه و مشاهده این حالت شاید دلیل عدم بروز واکوئل در سلول‌های هپاتوپانکراس و به ویروس و عدم رشد کامل سلول‌های ترشحی (B Cell) باشد. در بیماری لکه سفید در میگو بروز واکوئل در اثر افزایش ترشح سلول‌های ترشحی B cell برای تولید آنزیم‌هایی است که با ویروس مقابله نمایند، ولی در این مطالعه این حالت کم‌تر مشاهده گردید. هم‌چنین غالب اندام‌ها در این بررسی به ویروس آلوده بودند و با مطالعات Flegel (۱۷) و Syed Musthaq و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. در مطالعه Kakoolaki و همکاران، با بررسی آسیب‌شناسی مقایسه‌ای میگوی سفید غربی واکسینه، غیر واکسینه مواجهه با ویروس لکه سفید عنوان شد گنجیدگی ویروسی در بافت روده، اپیدرم، هپاتوپانکراس و اگزواسکلتال بوده است (۱۸) اما در این مطالعه در روده گنجیدگی ویروسی مشاهده نشد ولی در سایر بافت‌های مذکور گنجیدگی مشاهده شد که با مطالعه مذکور هم‌خوانی داشت. مطالعات Rout و همکاران (۱۱) نیز در ارتباط با گنجیدگی ویروسی در بافت‌های متعدد مشابه مطالعه حاضر بود. یکی از اندام‌هایی که در این بررسی در برابر ویروس لکه سفید آلودگی در آن مشاهده نگردید چشم‌های مرکب در میگوهای مورد مطالعه بود. براساس مطالعات Li و همکاران (۱۹)، Yeh و همکاران (۲۰)، چشم‌های مرکب و اعصاب میگوها در مواجهه با ویروس لکه سفید با تاخیر آلوده گردیده و عفونی شده و کنجیدگی‌های داخل سلولی در این بافت مشاهده می‌گردد، بنابراین عدم مشاهده کنجیدگی در مراحل آزمایش

- Polymerase Chain Reaction Observations of White Spot Syndrome Virus in Shrimp Specific Pathogen Free *Litopenaeus vannamei* in Iran. *Asian J Anim Vet Adv.* 4(6): 297-305.
11. Rout, N., Kumar, S., Jaganmohan, S. and Murugan, V., 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine.* 25(15): 2778-2786.
 12. Witteveldt, J., Vlak, J.M. and Van Hulten, M.C.W., 2006. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. *Dis Aqua Organisms.* 70(1-2): 167-170.
 13. Wang, P., Yang, L., Gu, Z., Weng, S., Yu, X.Q. and J.G, H., 2013. Nucleic acid-induced antiviral immunity in shrimp. *Antiviral Res.* 99(3): 270-280.
 14. Syed Musthaq, S.K., Madhan, S., Sahul Hameed, A.S. and Kwang J., 2009. Localization of VP28 on the baculovirus envelope and its immunogenicity against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Virology.* 391(2): 315-324.
 15. Taengchaiyaphum, S., Nakayama, H., Srisala, J., Khiev, R., Aldama-Cano, D.J., Thitamadee, S. and Sritunyaluksana, K., 2017. Vaccination with multimeric recombinant VP28 induces high protection against white spot syndrome virus in shrimp. *Dev Comp Immunol.* 76: 56-64.
 16. Kulkarni, A., Rombout, J.H.W.M., Singh, I.S.B., Sudheer, N.S., Vlak, J.M., Caipang, C.M.A., Brinchmann, M.F. and Kiron, V., 2013. Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: An uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunol.* 34(1): 159-166.
 17. Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture.* 258(1): 1-33.
 18. Kakoolaki, S., Afsharnasab, M., Sharifpour, I. and Ghaednia, B., 2015. The effect of created hemolymph apoptosis on WSSV Gama-vaccinated shrimp, *Litopenaeus vannamei* in WSSV disease control. *Iranian J Fisheries Sci.* 15(1): 301-310.
 19. Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C., 2010. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish Shellfish Immunol.* 28(1): 121-127.
 20. Yeh, S.P., Chen, Y.N., Hsieh, S.L. and Cheng, W., 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunol.* 26: 582-588.
- به دلیل کوتاه بودن دوره آزمایش بوده و اگر دوره آزمایش طولانی تر می گردید قطعاً کنجیدگی داخل سلولی در بافت چشم مرکب نیز مشاهده می شد. یکی از دلایل آن می تواند به کاهش تعداد گیرنده های سطحی ویروس بر روی سلول های چشم های مرکب این دسته از میگوها اشاره داشت که نبود آن ها مانع از ورود ویروس به داخل سلول ها و ایجاد عفونت می باشد. در پایان باید متذکر شد با توجه به مرگ و میر و خطر بالای ویروس لکه سفید و ضررهای اقتصادی فراوان حاصل از این بیماری، واکسیناسیون علیه آن ضروری است. لذا تمام تلاش محققین در این زمینه باید معطوف بر تهیه واکسنی موثر با کم ترین تلفات پس از واکسیناسیون، کم ترین عوارض و بالاترین ایمنی باشد.
- ### منابع
1. Fisheries statistical yearbook. 2011. The amount of shrimp breeding between 2001 and 2011. (In Persian)
 2. Khalil Pazir, M., Aeinjamshid, Kh., Lak, F., Afsharnasab, M. and Mahianeh, A., 2010. The effects of water quality on growth of the reared Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Scientific Fisheries Journal.* 18(4): 13-24. (In Persian)
 3. Rahmani, M., 2020. Nickel, Copper and Iron concentrations in sediments and Shrimp *Macrobrachium nipponense*, in Alagol international wetland. *Journal of Animal Environment.* 12(4): 495-500. (In Persian)
 4. Motamedi-Sedeh, F., Afsharnasab, M. and Heidareih, M., 2017. Comparison of White Spot Syndrome Virus Inactivation by Electron Irradiation and Formalin Treatment. *J. of Nucl Sci. and Tech.* 80(2): 89-94. (In Persian)
 5. Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. and Nauwynck, H.J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish. Dis.* 31(1): 1-18.
 6. Afsharnasab, M., Shojaei, Z. and Dashtyannasab, A., 2014. The study of Total Hemocyte Count and Total Protein Plasma in Shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Monodon baculovirus*. *Iranian Scientific fisheries Journal.* 23(1): 1-8. (In Persian)
 7. Feng, S., Wang, C., Hu, S., Wu, Q. and Li, A., 2017. Recent progress in the development of white spot syndrome virus vaccines for protecting shrimp against viral infection. *Arch Virol.* 162(10): 2923-2936.
 8. Seyed mortezaei, S.R., Houshmand, H., Ahangarzadeh, M., Mohammadidoust, M. and Afsharnasab, M., 2020. Histopathology of shrimp fed with algae *Gracillaria corticata* compared to shrimp fed with commercial in the face of white spot syndrome virus. *Journal of Animal Environment.* 12(4): 487-494. (In Persian)
 9. Solís-Lucero, G., Manoutcharian, K., Hernández-López, J. and Ascencio, F., 2016. Injected phage-displayed-VP28 vaccine reduces shrimp *Litopenaeus vannamei* mortality by white spot syndrome virus infection. *Fish Shellfish Immunol.* 55(10): 401-406.
 10. Afsharnasab, M., Mortezai, R., Yegane, V. and Kazemi, B., 2009. Gross Sign, Histopathology and