



فاکتورهای ایمنی میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با واکسن و ویروس

لکه سفید

مهرداد محمدی دوست¹، فاطمه حکمت پور^{1*}، محمد افشار نسب²، فرحناز معتمدی³

1- پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

2- موسسه علوم شیلاتی ایران

3- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی هسته‌ای

چکیده

با توجه به خسارت‌های وارده به صنعت میگو در اثر ابتلا به ویروس لکه سفید می توان با به‌کارگیری شیوه‌های نوین در جهت ایمن‌سازی، مقاومت میگوها را نسبت به بیماری لکه سفید افزایش داد. یکی از راهکارهای پیشگیری از ابتلا به ویروس استفاده از واکسن غیر فعال شده ویروس است. این تحقیق جهت بررسی اثرات واکسن ویروس لکه سفید (غیر فعال شده توسط اشعه گاما) بر فاکتورهای ایمنی میگو پاسبید غربی طراحی و اجرا گردید. مراحل اجرایی این آزمایش در مرکز تکثیر میگوی بندر امام (ره) صورت گرفت. در این آزمایش میزان فاکتورهای ایمنی میگوهای مواجهه شده با واکسن در مقایسه با تیمار شاهد مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل، میزان پروتئین کل، آنزیم پراکسیداز، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم فنل اکسیداز) نشان داد که تیمار آزمایشی واکسن توانسته تاثیر بسیار مثبتی در روند افزایش این شاخص‌ها ایجاد کند به طوری که میزان آن‌ها طی دوره‌ی آزمایش از روز 1 تا روز 25 به طور معنی‌داری افزایش یافت. براساس نتایج مطالعه حاضر دریافت واکسن سبب ارتقا ایمنی میگو در قیاس با تیمار شاهد شد. می‌توان گفت که واکسیناسیون پست لاروها می‌تواند با فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی مانع از ابتلاء آنها به بیماری ویروسی لکه سفید گردد.

کلمات کلیدی: میگو پاسبید غربی، واکسن غیر فعال، ویروس لکه سفید، فاکتورهای ایمنی

مقدمه

یکی از چالش‌های اصلی صنعت آبی‌پروری مسئله بهداشت و بیماری‌های آبیان است به طوری که سالیانه میلیون‌ها دلار به پرورش‌دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد می‌سازد. به منظور رشد و پویایی صنعت پرورش میگو باید برای کنترل بیماری‌ها جایگاه ویژه‌ای قائل بود. راهبرد مدیریتی کارآمد و نوآور و پرورش با تمهید ابزارهای خاص مدیریتی، نقش بسیار مهمی را در حصول این مهم ایفا می‌نماید. با توجه به اینکه بیماری ویروسی لکه سفید همواره به‌عنوان یک خطر جدی برای صنعت پرورش میگوی کشور محسوب می‌گردد، سعی می‌شود تا با به‌کارگیری شیوه‌های نوین در جهت ایمن‌سازی، مقاومت میگوها را نسبت به بیماری لکه سفید افزایش داد که در پی آن میزان رشد و بازماندگی میگوها بهبود یابد (افشارنسب و همکاران، 1390). از دیدگاه مدیریتی، همواره پیشگیری از بیماری‌ها، بهتر از تلاش برای مبارزه و درمان آن‌ها پس از وقوع است. غالباً قصور در انجام پیشگیری‌های ساده برای جلوگیری از عوامل بیماری‌زا، سبب بروز فجایع و مشکلات لاینحل می‌شود (افشارنسب، 1386). واکسن‌ها فرآورده‌های دارویی هستند که جهت پیشگیری از بیماری‌ها تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند و دارای حداقل عوارض جانبی می‌باشند. استفاده از واکسن‌ها موجب تحریک سیستم ایمنی بدن بعد از مواجهه با بیماری می‌شود و پس از نابودی عوامل بیماری‌زا، موجب پیدایش ایمنی موقت یا پایدار در مقابل این عوامل بیماری‌زا می‌گردد (Ramos-Carreño et al., 2014). هنگام تجویز عوامل پاتوژن غیرفعال، محققین شاهد افزایش ایمنی در برابر آن بیماری خاص بودند که همین امر آن‌ها را بر آن داشت که محصولی را تحت عنوان واکسن تهیه کنند (Bachere, 2000). براین اساس مطالعه‌ای جهت بررسی سیستم ایمنی میگوها تحت تیمار واکسن طراحی شد.



مراحل عملی و اجرایی این آزمایش در مرکز تکثیر میگوی بندر امام (ره) انجام شد. میگوهای پا سفید غربی تهیه شده در تانک-های بتنی مجهز به 12 سنگ هوا با ظرفیت 10 تنی (آبگیری تاحجم 3000 لیتر) ذخیره سازی شدند. روزانه سه وعده غذا به میزان 5 درصد بیوماس در ساعت‌های 8 صبح، 2 ظهر و 10 شب به میگوها داده شد. پس از 3 تا 5 روز سازگاری به منظور بررسی عدم وجود ویروس‌های (WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV, BP, IHNV, IMNV) و باکتری‌های ویبریو با استفاده از PCR میگوها مورد غربالگری قرار گرفتند. میگوهای با نتایج منفی، به صورت تزریق داخل عضلانی با سرنگ انسولین در دو دز با فاصله 14 روز واکسینه شدند. واکسن مورد استفاده از نوع ویروس غیر فعال لکه سفید تهیه شده با استفاده از روش پرتودهی گاما (پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی هسته‌ای) بود. میزان واکسن به ازاء هر 20 گرم میگو، واکسن با غلظت $LD50=1 \times 105.4 \text{ ml}^{-1}$ و با توجه به وزن میگوها محاسبه گردید. گروه دیگر میگوهای نتایج منفی بدون تزریق واکسن به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شدند. جهت بررسی تغییرات شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل، میزان پروتئین کل، آنزیم پراکسیداز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آنزیم فنل اکسیداز) از همولنف میگوها نمونه برداری گردید. برای همولنف گیری سرنگ‌های انسولین حاوی ماده ضد انعقاد از طریق سینوس شکمی (بعد از پنجمین پای قدم زن) به میزان 0/4 ml از همولنف میگو نمونه برداری شد. لازم به ذکر است که نمونه برداری در روزهای 1، 3، 9، 18 و 25 بعد از تزریق واکسن در تیمار T1 و همزمان در تیمار شاهد صورت گرفت.

نتایج و بحث

میزان هموسیت کل میگوهای واکسینه شده در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$; جدول 1). این افزایش ممکن است ناشی از فعالیت بالای بافت‌های همولنف ساز در میگوهای واکسینه‌شده باشد. پروتئین کل پلاسما یکی از مهم‌ترین پارامترهای دفاعی در میگو است. افزایش میزان پروتئین کل پلاسما در همولنف، می‌تواند ناشی از تأثیر مثبت واکسن باشد. افزایش پروتئین پلاسما می‌تواند در محافظت میگوها در مقابل با بیماری WSSV موثر باشد. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار حاوی واکسن مشاهده گردید. آنزیم پراکسیداز در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم عوامل خارجی می‌باشد. آنزیم پراکسیداز نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (Liu et al., 2000). آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز در تیمار T1 نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). از دیگر آنزیم‌های مؤثر در واکنش‌های دفاعی و سیستم ایمنی میگوها آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز است. این آنزیم در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. آنزیم فنل اکسیداز در تیمار T1 نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری، بیشتر بود ($P < 0/05$). این آنزیم از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در زمان فعال شدن سیستم proPO ایجاد گردیده و نقش اساسی در پروسه ملانیزه شدن ناشی از مواجهه با ذرات و یا پاتوژن-های خارجی دارد (Hernandez-Lopez et al., 1996). این سیستم بالاخص در شناسایی اجزا غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد (Van de Braak, 2002). بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که واکسیناسیون پست لاروها می‌تواند با فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی مانع از ابتلاء آنها به بیماری ویروسی لکه سفید گردد (Huant et al., 2010). در صورت مواجه میگوها با بیماری با توجه به بهبود سیستم ایمنی، کاهش تلفات و افزایش بازماندگی پیش بینی می‌گردد. استفاده از این تکنیک می‌تواند در حفظ سرمایه و رشد صنعت میگو در استان نقش بسزایی ایفا نماید.

جدول 1: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر فاکتورهای سیستم ایمنی میگوهای پاسفید

تیمار	1	3	9	18	25
-------	---	---	---	----	----



					هموسیت کل ($\times 10^5$ cell/ml)
b	b	1.04±59.26 ^b	b	b	تیمار 1 (واکسن)
8.98±155.90	1.60±69.30		0.68±32.41	0.07±32.03	
a	a	0.32±19.17 ^a	a	a	تیمار 2 (شاهد)
0.86±19.00	0.58±19.62		0.97±19.79	0.13±19.53	
					پروتئین کل (mg/ml)
b	b	2.02±62.33 ^b	b	b	تیمار 1 (واکسن)
0.44±83.20	0.93±73.00		0.64±49.90	0.15±49.45	
a	a	0.85±34.35 ^a	a	a	تیمار 2 (شاهد)
2.80±36.10	1.60±33.20		2.65±33.95	0.20±33.70	
					آنزیم پروکسیداز ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$)
b	b	0.02±6.37 ^b	b	b	تیمار 1 (واکسن)
0.08±7.14 ^b	0.09±6.68 ^b		0.04±6.21 ^b	0.00±6.18	
a	a	0.28±5.80 ^a	a	a	تیمار 2 (شاهد)
0.35±5.80 ^a	0.42±5.69 ^a		0.21±5.74 ^a	0.02±5.90	
					آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (Activity Uml^{-1})
b	b	104.08±2050.0	b	b	تیمار 1 (واکسن)
88.19±3066.67	81.92±2573.33		58.12±1506.67	10.37±1469.08	
a	a	15.00±495.00	a	a	تیمار 2 (شاهد)
5.00±496.00	21.50±499.50		32.15±510.00	2.91±503.97	
					آنزیم فنول اکسیداز ($\text{U min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$)
b	b	2.91±471.67	b	b	تیمار 1 (واکسن)
10.27±632.67	2.60±525.33		1.53±423.00	2.10±418.43	
a	a	23.92±381.33	a	a	تیمار 2 (شاهد)
66.23±419.33	9.64±374.00		1.73±390.00	0.79±386.55	

حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < 0/05$).

فهرست منابع

- افشار نسب، م. 1386. بیماری ویروسی میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. 210 ص.
- افشار نسب، م.، عارف زاده، ع.، مرتضایی، ر.، دشتیان نسب، ع.، جرف، ا. 1390. مطالعه آسیب شناسی و مولکولی سندروم ویروس تورا در میگو پاسبید در ایران. مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای. 8: 459-466.
- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Huant, J., Yang, Y. & Wang, A. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 240-244.
- Hernandez-Lopez, J., Golkxs-Galwin, T. & Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C(1), 61-66.
- Liu, Y., Jang, X. L., Lv, Q. & Guan, H. S. 2000. Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis. *Journal of Fisheries of China*, 24(6), 549-553.
- Ramos-Carreño, S., Valencia-Yáñez, R., Correa-Sandoval, F., Ruíz-García, N., Díaz-Herrera, F., Giffard-Mena, I., 2014. White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. *Archives of virology* 159, 2213-2222.



Van De Braak, C. B. T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PhD thesis, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Sciences. PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands., Pp.168.

***Litopenaeus vannamei* immune factors in the presence of white spot virus vaccine**

Abstract

Regarding the damages to the shrimp industry due to the presence of white spot virus, it is possible to increase the resistance of shrimp to white spot disease by adopting new methods for immunization. One of the ways to prevent the virus is to use an inactivated vaccine. The present study was designed to evaluate the effects of white spot virus vaccine (gamma irradiant WSSV) on immunity factors of *Litopenaeus Vannamei*. The experiment was done in Bandar Imam Khomeini hatcheries. In this study, the immunological parameters of shrimp that exposed to vaccine were compared with the control group. Results indicated that immune parameters such as total hemocyte count (THC), total protein plasma (TPP), superoxide dismutase (SOD) activity, peroxidase activity (POD) and phenoloxidase activity (PO) were higher than the control groups. Also the immunity factors increased during the period from day 1 to day 25 significantly. Therefore, this experiment concluded that gamma irradiant WSSV is effective immunostimulants in *L. Vannamei*.

Keywords: Inactivated vaccine, immunological factors, *Litopenaeus Vannamei*, white spot virus,