

ایمنی زایی تزریق ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه بر شاخص‌های ایمنی و بازماندگی میگو پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

مهداد محمدی دوست^۱، محمد افشار نسب^۲، شاپور کاکولکی^۳، فرحناز معتمدی سده^۴،

حسین هوشمند^۱، مینا آهنگر زاده^۱، لفته محسنی نژاد^{۱*}

۱- پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۲- بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

۳- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته‌ای کشور، سازمان انرژی اتمی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۵

چکیده

این تحقیق جهت بررسی ایمنی زایی تزریق ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه بر شاخص‌های ایمنی و بازماندگی میگو پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) طراحی و اجرا گردید. مراحل عملی و اجرایی این آزمایش در مرکز تکثیر میگوی بندر امام (ره) و از ۱۳۹۲ شروع و در ۱۳۹۳ پایان پذیرفت. در این آزمایش میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی میگوهای مواجهه شده با ویروس غیرفعال شده لکه سفید توسط اشعه در مقایسه با تیمار شاهد مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، میگوهای تغذیه شده با تزریق ویروس غیرفعال شده لکه سفید با اشعه در مقایسه با تیمار شاهد در مواجهه با ویروس لکه سفید، میزان بازماندگی بالاتری داشتند. همچنین تجزیه و تحلیل شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل، میزان پروتئین کل، آنزیم پراکسیداز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آنزیم فنل اکسیداز) نشان داد که تیمار آزمایشی ایمنی زایی ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه توانسته تأثیر بسیار مثبتی در روند افزایش این شاخص‌ها ایجاد کند به طوری که میزان آن‌ها طی دوره آزمایش از روز ۱ تا روز ۲۵ به طور معنی‌داری افزایش یافت. بر اساس نتایج آزمایش می‌توان گفت که تیمار فوق در مقایسه با تیمار شاهد، سبب ارتقا ایمنی میگو و افزایش بازماندگی شده است.

کلمات کلیدی: میگو پا سفید غربی، واکسن لکه سفید، میزان بازماندگی، فاکتورهای ایمنی.

مقدمه

تولید جهانی آبزیان و عرضه فرآورده‌های آبی در طی چند سال اخیر همواره روند رو به رشدی را داشته و نقش بسیار مهمی در امنیت غذایی مردم جهان ایفا می‌کند. پرورش آبزیان به منظور تولید و تأمین بخشی از پروتئین مورد نیاز انسان‌ها هست و ۴۴ درصد مردم در طول سال از ماهی استفاده می‌کنند (محسنی نژاد و پیغان، ۱۳۹۴). بخش کشاورزی و منابع طبیعی ارتباط تنگاتنگی با محیط‌زیست دارد و نقش مهمی را در اقتصاد کشورها، به خصوص کشورهای در حال توسعه ایفا می‌نماید (مسرور رودسری و همکاران، ۱۳۹۱). یکی از مهم‌ترین فناوری‌های تولید غذاست افزایش تولید آبزیان مرهون افزایش تولید در زیر بخش آبی‌پروری است (FAO, 2010). میگو از آبزیان باارزش اقتصادی بالا است که با توجه به رشد و توسعه بخش صیادی آن و با توجه به محدودیت ذخایر دریایی میگو انتظار افزایش کل صید چندانی را از آن نمی‌توان داشت. پرورش میگو در بدو پیدایش به شکل بسیار ساده انجام می‌گرفت و معمولاً به عنوان محصول جنبی در کنار ماهیان دریایی و حتی موجود ناخواسته در حوضچه‌های ساحلی پرورش می‌یافت ولی امروزه پرورش میگو در کشورهای در حال توسعه که دارای مناطق مناسب می‌باشند، در حال حاضر حدود ۹۷۱۰ هکتار استخر آماده بهره‌برداری در کشور وجود دارد، امکانات زیربنایی برای احداث ۱۶۱۵۲ هکتار استخر نیز فراهم شده است (یاراحمدی و همکاران، ۱۳۹۵) از چالش‌های اصلی صنعت آبی‌پروری مسئله بهداشت و بیماری‌های آبزیان است. در آبزیان ابزار اندکی جهت تشخیص و پایش بیماری وجود دارد (خارا و همکاران، ۱۳۹۲). به طوری که سالیانه میلیون‌ها دلار به

پرورش دهندگان ماهی و میگو خسارت وارد می‌سازد. اگر بناست صنعت پرورش میگو به رشد و پویایی خود ادامه دهد 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. 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 (افشار نسب، ۱۳۸۶). با توجه به میزان برداشت میگوهای پرورشی در کل ایران و اشتغال‌زایی این صنعت و همچنین چشم‌انداز سال‌های آتی در مورد تأمین منابع غذایی، بررسی راهکارهایی برای بهداشت و بهبود شرایط زیستی و ایمنی میگوهای پرورشی ضروری می‌نماید، چراکه عوامل پاتوژن موجود در پیرامون میگوهای پرورشی، به عنوان یک استرس مهم محسوب می‌شود که می‌توان با بهبود کارایی سیستم ایمنی، میگوها را در برخورد با این عوامل نامطلوب کمک کرده و در واقع این استرس کم‌رنگ گردد.

با وجودی که سخت‌پوستان دارای پاسخ ایمنی همورال از طریق تولید ایمونوگلوبولین نمی‌باشند، ولی پاسخ نیمه ایمنی با تولید مواد شبه ایمونوگلوبولینی بر ضد بیماری ویروسی در میگو از طریق سلول‌های ایمنی موجود در همولنف از جمله سلول‌های هیالونوسیت، سمی گرانولار و گرانولار ثابت گردیده است (Ramos-Carreño *et al.*, 2014).

مکانیسم‌های پاسخ‌های ایمنی در میگو شامل: فاگوسیتوز، ایجاد ندول، سایتوتوکسیستی (مسمومیت سلولی)، کپسول دار نمودن و سیستم پروفنل اکسیداز

بیشتر آن‌ها آنتی‌ژن‌های خالص شده، پروتئین‌های نو ترکیب و پروتئین‌های طبیعی میکروارگانیزم‌ها می‌باشند. واکسن‌های غیرفعال شده شامل کل ارگانیزم غیرفعال شده که ایمونوژنیستی آن حفظ گردیده، می‌باشد؛ غیرفعال‌سازی و آزمون‌های تأیید سلامتی بحرانی‌ترین مرحله این واکسن‌هاست که با روش‌های حرارتی، مواد شیمیایی و پرتوها انجام می‌شود (صالحی، ۱۳۸۶). در مقایسه با مطالعات صورت گرفته روی محرک‌های سیستم ایمنی میگوها اطلاعات محدودی در رابطه با ایمن‌سازی میگوها وجود دارد. گفتنی است که سابقه تمامی این مطالعات به واکسیناسیون میگوها (سخت‌پوستان) به منظور محافظت و جلوگیری از مرگ‌ومیر میگوها بازمی‌گردد. در این مطالعات مشاهده شد که یک پاسخ شبه ایمنی در میگوهای مقاوم به ویروس‌های بیماری‌زا همانند ویروس بیماری لکه سفید ایجاد شده بود که به دلیل وجود فاکتورهای خنثی‌کننده در همولنف میگوهای واکسینه شده، در مواجهه بعدی میگوها با ویروس به دلیل فعالیت سیستم شبه ایمنی، مقاومت میگوها در برابر بیماری افزایش یافت که در نتیجه آن مرگ‌ومیر میگوها با کاهش همراه شد (Johnsona *et al.*, 2008).

امروزه با استفاده از پروتئین‌های نو ترکیب، می‌توان موجودات را با مقادیر بالایی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی واکسینه کرد که در پی آن میزان رشد و بازماندگی‌های آن‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد، لذا با توجه به اینکه بیماری ویروسی لکه سفید همواره به عنوان یک خطر جدی برای صنعت پرورش میگوی کشور محسوب می‌گردد، سعی خواهد شد تا با به کارگیری شیوه‌های نوین در جهت ایمن‌سازی، مقاومت میگوها را نسبت به بیماری لکه سفید افزایش داد که در پی آن

است؛ 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). واکسن‌ها فرآورده‌های دارویی هستند که جهت پیشگیری از بیماری‌ها تولید و مورداستفاده قرار گرفته و دارای حداقل عوارض جانبی می‌باشند. استفاده از واکسن‌ها موجب تحریک سیستم ایمنی بدن بعد مواجهه با بیماری شده و پس از نابودی عوامل بیماری‌زا، موجب پیدایش ایمنی موقت یا پایدار در مقابل این عوامل بیماری‌زا می‌شود (Rámos-Carreño *et al.*, 2014). به علت فعالیت‌های شدید آبی‌پروری، میگوها همواره در معرض درگیری با عوامل بیماری‌زایی ویروسی از جمله ویروس لکه سفید بوده‌اند. از این رو راهکارهای متعددی از جمله بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست لاروهای عاری از عوامل بیماری‌زا و مقاوم به عوامل بیماری‌زا، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی و استفاده از واکسن جهت مصون‌سازی میگوها به منظور کنترل و پیشگیری از بیماری لکه سفید ارائه شده است (Namikoshi *et al.*, 2004).

از انواع واکسن‌ها می‌توان به زنده یا تخفیف‌حداً یافته، کشته یا غیرفعال و زیر واحدی و توکسوئید اشاره کرد. واکسن‌های زنده باعث ایجاد عفونت بدون علائم و خود محدودکننده می‌شوند؛ بنابراین سیستم ایمنی میزبان را مشابه با عفونت‌های طبیعی تحریک و سبب حفاظت طولانی مدت با کمترین میزان تجویز واکسن در میزبان می‌شوند. واکسن‌های زیر واحدی ایده آل شامل آنتی‌ژن‌های ضروری برای پاتوژن‌های میکروبی است که در القاء پاسخ‌های ایمنی حفاظتی مؤثرند و

مواد و روش‌ها

مراحل عملی و اجرایی این آزمایش در مرکز تکثیر میگوی بندر امام خمینی (ره) متعلق به اداره کل شیلات خوزستان و از آبان ۱۳۹۲ شروع گردید و در بهمن ۱۳۹۳ پایان پذیرفت. ابتدا میگوهای پافسید غربی مورد نیاز تهیه و به ایستگاه بندر امام خمینی (ره) منتقل گردید. سپس میگوها به مدت ۳ تا ۵ روز در شرایط آزمایشگاهی آداپت شدند. بعد از مرحله آداپتاسیون، نسبت به غربالگری میگوها برای عدم وجود ویروس‌های (WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV,) و باکتری‌های ویبریو با استفاده از PCR اقدام شد.

تزریق ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه، با منفی شدن آزمایش‌ها فوق، جهت مواجهه میگوها با واکسن به ازای هر ۲۰ گرم میگو، واکسن با غلظت $LD50=1 \times 10^{5.4} \text{ ml}^{-1}$ مواجهه شد و با توجه به وزن میگوها میزان واکسن برای مواجهه محاسبه گردید. واکسیناسیون، به صورت تزریق داخل عضلانی با سرنگ انسولین در دو دز بافاصله ۱۴ روز انجام شد.

مدیریت سیستم آزمایشی، برای انجام آزمایش از تانک‌های بتنی با ظرفیت ۱۰ تنی که با ۳۰۰۰ لیتر آب، آبیگری شدند، استفاده گردید. برای هوادهی در هر یک از تانک‌ها، ۱۲ سنگ هواده؛ که در فواصل یکسان در تمام سطح آب به صورت یکسان هوادهی را انجام می‌دادند؛ بکار رفت. همچنین به‌طور روزانه، تعویض آب تانک‌ها به میزان ۱۰ الی ۱۵٪ انجام پذیرفت.

پارامترهای دما، pH و اکسیژن محلول آب روزانه در دو نوبت صبح و عصر و شوری آب یک‌بار در روز در نوبت صبح، به وسیله دستگاه مولتی پارامتر (مارک WTW) و با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری و ثبت گردید.

میزان رشد و بازماندگی میگوها بهبود یابد (افشار نسب و همکاران، ۱۳۹۰).

در ایران اولین گزارش مرتبط با تولید واکسن برای بیماری لکه سفید به گزارش نهایی پروژه "بررسی امکان تهیه واکسن غیرفعال جهت پیشگیری از بیماری ویروسی لکه سفید با استفاده از روش‌های هسته‌ای و غیر هسته‌ای در میگوی سفید هندی" برمی‌گردد که توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی هسته‌ای به انجام رسید (Motamedi et al., 2012).

در این پروژه مشخص گردید که ویروس لکه سفید پرتو داده شده با سه روش اشعه گاما، بیم‌الکترون و فرمالین دارای اثرات متفاوت بوده و بهترین تأثیر واکسن تهیه شده را می‌توان در پرتوهای تابیده به روش گاما مشاهده نمود؛ و در نهایت نتیجه‌گیری شد که اثر حفاظتی واکسن تولیدی با اشعه گاما اثر بهتری با واکسن حاصل از فرمالین و بیم‌الکترون دارد (Motamedi et al., 2012).

یکی از مهم‌ترین میگوهای پرورشی کشور، میگوی وانامی است که دارای توانایی متعددی از جمله جزء سریع‌الرشدترین گونه‌های تجاری میگو، مقاوم به دامنه وسیعی از تغییرات دما و شوری، ماندگاری بالا در مراحل لاروی در هجری و در شرایط استخرهای پرورشی می‌باشد (Tamayo, 2006). لذا تحقیق حاضر به منظور افزایش سطح ایمنی میگوی پافسید غربی و اثرات بررسی ایمنی زایی تزریق ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه بر شاخص‌های ایمنی و بازماندگی میگو پافسید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بر این گونه میگو طرح و اجرا گردید.

شد؛ سپس ۲۰ میکرو لیتر از مخلوط برداشته شد، سپس در شیار H لام نئوبار زیر لامل تخلیه گردید. در ادامه بعد از گذشت ۱ دقیقه شمارش هموسیت ها صورت گرفت. شمارش بدین صورت است که از ۲۵ خانه وسط ۵ خانه به صورت تصادفی شمارش شده، میانگین آن‌ها را گرفته و در عدد 10^4 و رقت ($2.5 = \frac{1}{0.4}$) همولنف موجود ضرب گردید (Kakoolaki et al., 2010).

میزان پروتئین کل پلاسما بر اساس روش برادفورد با استفاده آلومین سرم گاوی (BSA) به عنوان یک منحنی استاندارد اندازه گیری شد (میلی گرم در لیتر).

جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم پروکسیداز، مقدار ۵۰ میکرو لیتر از محلول اصلی واکنشی (Master reaction mix) (۴۶ میکرو لیتر محلول بافر + ۲ میکرو لیتر Fluorescent Peroxidase + ۲ میکرو لیتر H_2O_2) را در چاهک هر نمونه و کنترل مثبت ریخته شد و با کمک حرکت افقی و پیست، به خوبی مخلوط شد. سپس پلت چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از ۳ دقیقه اندازه گیری گردید. برای روش رنگ سنجی، میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد و برای روش فلورومتريک به شرح زیر عمل گردید: $FLU_{initial} \lambda_{ex}=535/\lambda_{em}=585$ nm

برای میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، ۲۰ میکرو لیتر از محلول نمونه، در دو ظرف و بلنک ۲ ریخته شد و مقدار ۲۰ میکرو لیتر آب به هر کدام از بلنک ۱ و ۳ افزوده و به خوبی مخلوط شد. بعد از آن، مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از WST به هر یک از محلول‌ها افزوده و مخلوط شد. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میکرو لیتر از محلول رقیق شده بافر، به هر یک از بلنک‌های ۲ و ۳

دوره نوری در داخل سالن‌های پرورش به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. روزانه سه وعده غذا به میزان ۵ درصد بیوماس غذا دهی در ساعت‌های ۸ صبح، ۲ ظهر و ۱۰ شب انجام شد که برای هر تیمار و تکرار به صورت یکسان بود، انجام شد.

تیمارهای آزمایشی

به منظور بررسی اثرات واکسن ویروس لکه سفید بر فاکتورهای ایمنی و بازماندگی میگوهای پا سفید غربی، تیمارهای آزمایشی زیر طراحی و اجرا گردید.

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی

T1 (تیمار ۱)	تیمار واکسن لکه سفید	۳ تکرار
T2 (تیمار ۲)	تیمار شاهد	۳ تکرار

نمونه برداری، جهت بررسی تغییرات شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل، میزان پروتئین کل، آنزیم پراکسیداز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آنزیم فنل اکسیداز) از همولنف میگوها و برای آسیب‌شناسی بافتی، از مقاطع بافتی نمونه برداری گردید. برای همولنف گیری ابتدا سرنگ‌های انسولین با گیج ۲۵ به میزان ۰/۶ ml از ماده ضد انعقاد پر و سپس از طریق سینوس شکمی (بعد از پنجمین پای قدم زن) به میزان ۰/۴ ml از همولنف میگو نمونه برداری شد. لازم به ذکر است که نمونه برداری در روزهای ۱، ۳، ۹، ۱۸ و ۲۵ قبل و بعد از مواجهه با ویروس انجام گردید.

سنجش شاخص‌های ایمنی

شمارش هموسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد. در ابتدا ۵۰ میکرو لیتر از مخلوط همولنف- ماده ضد انعقاد با ۵۰ میکرو لیتر از محلول بافر فرمالین خنثی ۱۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط و نگه داشته

معادل تغییر در جذب ۰/۰۰۱ در هر دقیقه در هر میلی‌لیتر همولنف تعریف گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با آزمون آماری اسمیرنوف کولموگراف و همگنی واریانس‌ها به وسیله آزمون Leven تست شد. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد، سپس وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌های به‌دست‌آمده در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) به کمک پس آزمون Dancan، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 و برای رسم شکلها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

درصد بازماندگی

بر اساس جدول ۱ و شکل ۱ و ۲، میزان بقا در تیمار حاوی واکسن از ابتدا تا انتهای آزمایش، ۱۰۰ درصد بود؛ ولی در مورد تیمار شاهد این روند ۱۰۰ درصد بازماندگی، در روز ۲۵ به تقلیل یافت؛ ولی اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱ نداشت.

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی درصد بازماندگی میگوهای پافسید

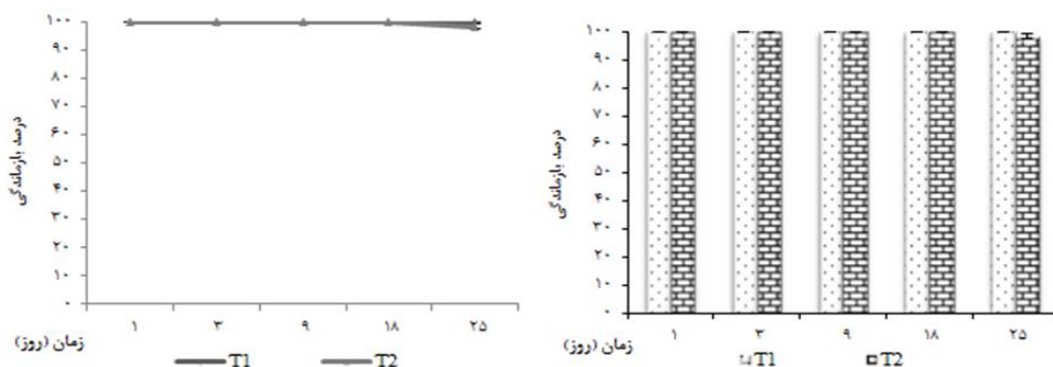
تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
T1 (واکسن)		۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰
T2 (شاهد)		۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۱۰۰±۰,۰۰	۹۸,۳۳±۰,۸۸

(میانگین ± خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).

اضافه و مخلوط شد. سپس مقدار ۲۰ میکرو لیتر محلول آنزیم به بلانک ۱ نمونه اضافه و کاملاً مخلوط گردید (از آنجا که سوپر اکسید بلافاصله بعد از افزودن آنزیم آزاد می‌شود بهتر است از multiple channel pipette استفاده کنید تا از تأخیر زمانی و غیر همزمانی واکنش‌ها جلوگیری شود). در آخر ظروف نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد، میکرو پلت ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر را قرائت گردید و مقدار SOD فعال (بر اساس درصد بازماندگی) با کمک فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\text{SOD Activity} = \frac{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank2})}{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3})}$$

جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز از روش Huang و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از ترتیب که ۲۰ میلی‌لیتر از پلاسما در چاهک اسپکتروفتومتر به عنوان یک نمونه ناشناخته و ۲۰ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد Strewed// در چاهک دیگر به عنوان شاهد Strewed قرار داده و پس از ۱ دقیقه، ۸۸۰ میلی‌لیتر محلول L-DOPA به هر دو چاهک اضافه شد. میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر، هر ۱۰ ثانیه تا ۱۲۰ ثانیه ثبت گردید. هر یک واحد فعالیت آنزیم



شکل ۱ و ۲: مقایسه روند درصد بازماندگی و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن لکه سفید

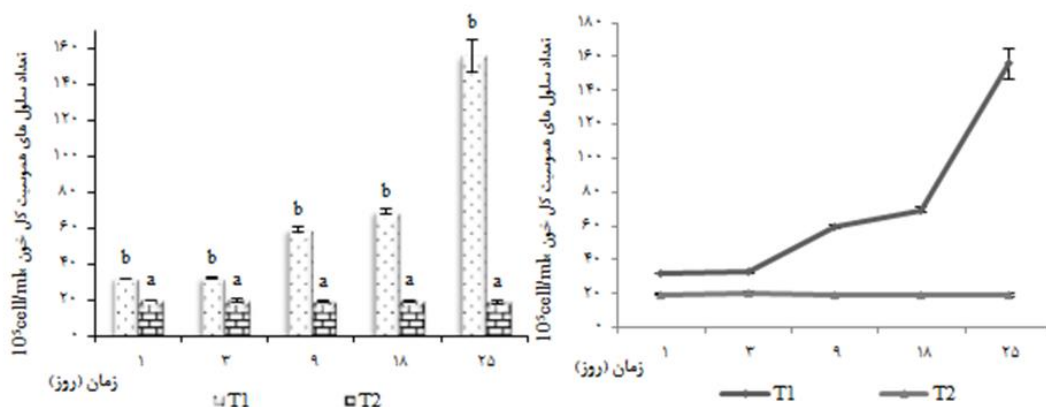
میزان هموسیت کل (THC)

بر اساس جدول ۳ و شکل ۳ و ۴؛ هموسیت کل در تیمار T1 به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بوده است ($P < 0.05$).

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر هموسیت کل ($\times 10^5 \text{ cell/ml}$) میگوهای پا سفید

تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (واکسن)		$32,03 \pm 0,07^b$	$32,41 \pm 0,68^b$	$59,26 \pm 1,04^b$	$69,30 \pm 1,60^b$	$155,90 \pm 8,98^b$
تیمار ۲ (شاهد)		$19,53 \pm 0,13^a$	$19,79 \pm 0,97^a$	$19,17 \pm 0,32^a$	$19,62 \pm 0,58^a$	$19,00 \pm 0,86^a$

(میانگین \pm خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < 0.05$).



شکل ۳ و ۴: مقایسه شاخص هموسیت کل و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن

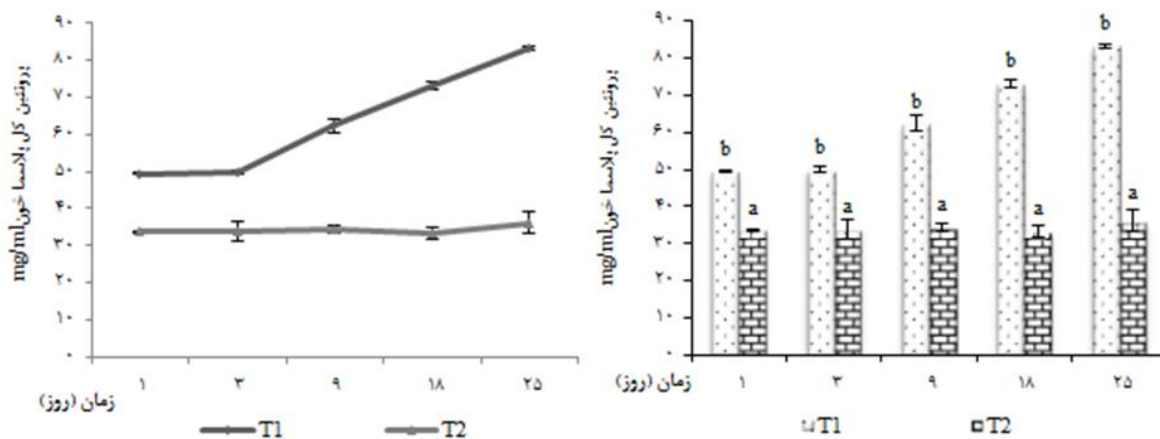
میزان پروتئین کل (TPP)

بر اساس جدول ۴ و شکل ۵ و ۶؛ پروتئین کل در تیمار T1 نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری، بیشتر بود ($P < 0.05$).

جدول ۴: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر پروتئین کل (mg/ml) میگوهای پا سفید

تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (واکسن)		۴۹,۴۵±۰,۱۵ ^b	۴۹,۹۰±۰,۶۴ ^b	۶۲,۳۳±۲,۰۲ ^b	۷۳,۰۰±۰,۹۳ ^b	۸۳,۲۰±۰,۴۴ ^b
تیمار ۲ (شاهد)		۳۳,۷۰±۰,۲۰ ^a	۳۳,۹۵±۲,۶۵ ^a	۳۴,۳۵±۰,۸۵ ^a	۳۳,۲۰±۱,۶۰ ^a	۳۶,۱۰±۲,۸۰ ^a

(میانگین ± خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).



شکل ۵ و ۶: مقایسه شاخص میزان پروتئین کل و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن

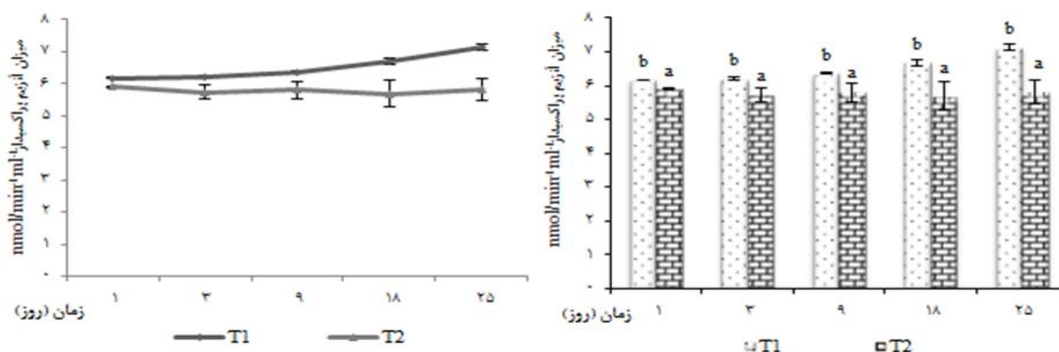
میزان آنزیم پرواکسیداز (POD)

بر اساس جدول ۵ و شکل ۷ و ۸؛ آنزیم پرواکسیداز در تیمار T1 نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری، بیشتر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۵: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر آنزیم پرواکسیداز (nmol·min⁻¹·ml⁻¹) میگوهای پا سفید

تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (واکسن)		۶,۱۸±۰,۰۰ ^b	۶,۲۱±۰,۰۴ ^b	۶,۳۷±۰,۰۲ ^b	۶,۶۸±۰,۰۹ ^b	۷,۱۴±۰,۰۸ ^b
تیمار ۲ (شاهد)		۵,۹۰±۰,۰۲ ^a	۵,۷۴±۰,۲۱ ^a	۵,۸۰±۰,۲۸ ^a	۵,۶۹±۰,۴۲ ^a	۵,۸۰±۰,۳۵ ^a

(میانگین ± خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).



شکل ۷ و ۸: مقایسه شاخص آنزیم پرواکسیداز و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن

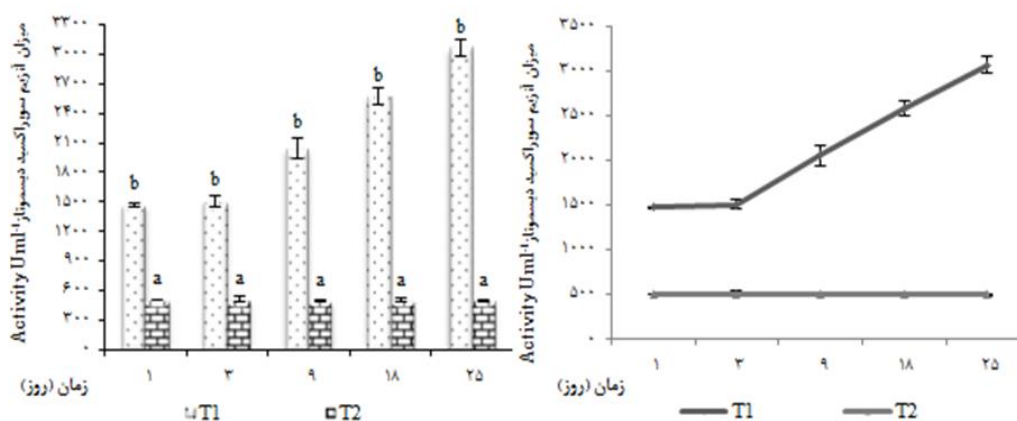
میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

بر اساس جدول ۶ و شکل ۹ و ۱۰؛ آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار T1 به طور معنی داری، بیشتر بود ($P < 0/05$).

جدول ۶: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (Activity Uml^{-1}) میگوهای پا سفید

تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (واکسن)		$1469,08 \pm 10,37^b$	$1506,67 \pm 58,12^b$	$2050,00 \pm 104,08^b$	$2573,33 \pm 81,92^b$	$3066,67 \pm 81,19^b$
تیمار ۲ (شاهد)		$503,97 \pm 2,91^a$	$510,00 \pm 32,15^a$	$495,00 \pm 15,00^a$	$499,50 \pm 21,50^a$	$496,00 \pm 5,00^a$

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



شکل ۹ و ۱۰: مقایسه شاخص آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن

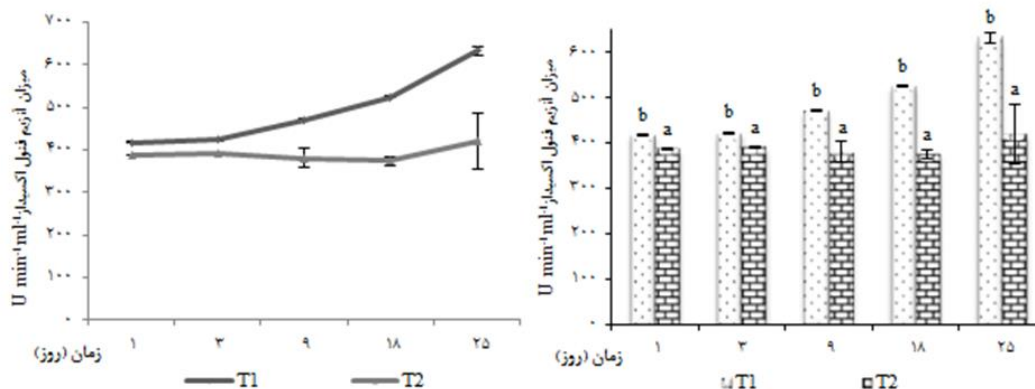
میزان آنزیم فنول اکسیداز (PO)

بر اساس جدول ۷ و شکل ۱۱ و ۱۲ آنزیم فنول اکسیداز در تیمار T1 نسبت به شاهد به طور معنی داری، بیشتر بود ($P < 0/05$).

جدول ۷: نتایج حاصل از بررسی تأثیر واکسن بیماری لکه سفید بر آنزیم فنول اکسیداز ($\text{U min}^{-1}\text{ml}^{-1}$) میگوهای پا سفید

تیمار	روز	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
تیمار ۱ (واکسن)		$418,43 \pm 2,10^b$	$423,00 \pm 1,53^b$	$471,67 \pm 2,91^b$	$525,33 \pm 2,60^b$	$632,67 \pm 10,27^b$
تیمار ۲ (شاهد)		$386,55 \pm 0,79^a$	$390,00 \pm 1,73^a$	$381,33 \pm 23,92^a$	$374,00 \pm 9,64^a$	$419,33 \pm 66,23^a$

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



شکل ۱۱ و ۱۲: مقایسه شاخص آنزیم فنول اکسیداز و روند آن در تیمار آزمایشی شاهد و واکسن

بحث

هموسیت‌ها، نقش مهمی در ایمنی میگو داشته و میزان آن‌ها در گردش خون، یکی از فاکتورهای تعیین کننده در سلامتی میگوها می‌باشد؛ در تحقیق حاضر، میزان THC میگوهای واکسینه شده در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری بالاتر بود؛ و این افزایش ممکن است ناشی از فعالیت بالای بافت‌های همولنف ساز در میگوهای واکسینه شده باشد. بر اساس گزارش Chen and Cheng در سال ۲۰۱۴ تغییر در میزان TPP به اندازه، سن، جنس، وضعیت تغذیه و شرایط محیطی بستگی دارد.

پروتئین کل پلاسما یکی از مهم‌ترین پارامترهای دفاعی در میگو بوده، زیرا تعداد زیادی از الگوهای شناسایی رسپتورها (PRRs) شبیه متصل کننده‌های پروتئین گرم منفی، لیپوپلی ساکارید یا متصل کننده‌های پروتئینی بتا ۱ و ۳ گلوکان، پروتئین حاوی تیواستر، پروتئین مرتبط با فیبرینوژن که در همولنف و هپاتوپانکراس یافت می‌شوند مرتبط با TPP هستند (Wang *et al.*, 2012). به نظر می‌رسد افزایش میزان TPP در همولنف، ناشی از تأثیر مثبت واکسن بوده که می‌تواند در محافظت میگوها در مقابل با بیماری WSSV مؤثر باشند.

بر اساس نتایج حاصله، میگوهای تیمار ویروس غیرفعال شده بیماری لکه سفید با اشعه در مقایسه با میگوهای تیمار شاهد، به طور معنی داری ($P < 0.05$) از بقا و درصد بازماندگی بیشتری برخوردار است؛ زیرا به دنبال واکسیناسیون پست لاروها و فعال شدن سیستم ایمنی میگوها و مراکز خون ساز در پست لاروهای واکسینه شده نسبت به پست لاروهای غیر واکسینه به دلیل افزایش تغذیه و صرف انرژی زیاد، بازماندگی آن‌ها افزایش یافته است. Witteveldt و همکاران (۲۰۰۹) عنوان نمودند که به دنبال واکسیناسیون میگوها توسط پروتئین‌های نو ترکیب MBP-VP19 و HIS-VP28 علاوه بر تأخیر در ابتلا میگوها به بیماری یک کاهش محسوس در میزان تلفات در مواجهه مجدد با ویروس مشاهده می‌شود، به گونه‌ای که این اثرات در واکسن ساخته شده توسط MBP-VP19 و یا مخلوط MBP-VP19 و HIS-VP28 بیشتر بود؛ لذا واکسیناسیون با پروتئین‌های پوشش دار لکه سفید و نو ترکیب می‌تواند سبب افزایش بازماندگی میگوها گردد؛ که این نتیجه، تأیید کننده نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه حاضر، افزایش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار حاوی واکسن مشاهده گردید؛ آنزیم پراکسیداز (POD) فاکتور مؤثر دیگر موجود در پلاسما بوده که به شدت به مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم پارتیکل‌های خارجی می‌باشد. POD نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (Liu *et al.*, 2000) و ارگانل‌های پراکسیدازم حاوی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، POD و کاتالاز بوده که می‌توانند موجب حفاظت سلول‌ها از تغییر مواد تغییردهنده سلول‌ها نظیر H_2O_2 ، آب غیر سمی و رادیکال‌های اکسیژن آزاد باشد (Wang *et al.*, 2012).

از دیگر آنزیم‌های مؤثر در واکنش‌های دفاعی و سیستم ایمنی میگوها، آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) بوده که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیر هوازی پدید می‌آید؛ این آنزیم در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. میزان SOD در تحقیق حاضر در تیمار T1 نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$).

نتایج تحقیق Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) و Chang و همکاران (۲۰۰۹) با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی داشته و نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی همچون واکسن، موجب افزایش SOD در میگوی ببری سیاه شده است.

آنزیم دیگری که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل اکسیداز (PO) می‌باشد؛ سیستم پروفنل اکسیداز (proPO) یکی از اجزای سیستم دفاعی میگو می‌باشد؛ این سیستم بالأخص در شناسایی اجزای غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد

(Van de Braak, 2002). 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 پاتوژن‌های خارجی دارد (Hernandez-Lopez *et al.*, 1996). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار میگوهای واکسینه شده بسیار بالا گزارش شده است.

Choi و همکاران (۲۰۱۱)، عنوان نمودند که در میگوهای واکسینه شده در مقایسه با میگوهای غیر واکسینه یک تأخیر ۴ تا ۱۰ روزه در نسخه‌برداری از ژنوم ویروس ایجاد می‌شود؛ لیکن واکسیناسیون میگوها توسط پروتئین‌های ترکیبی علاوه بر فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها مانع از ورود ویروس لکه سفید به داخل سلول نیز خواهند شد (Ramos-Carreño *et al.*, 2014). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میزان تلفات در تیمار واکسینه شده توسط ویروس غیرفعال شده لکه سفید نسبت به تیمار گروه شاهد کمتر بود؛ می‌توان گفت که واکسیناسیون پست لاروها می‌تواند با فعال نمودن سیستم ایمنی میگوها و ایجاد یک پاسخ شبه ایمنی مانع از ابتلا آن‌ها به بیماری ویروسی لکه سفید شود (Huant *et al.*, 2010).

Witteveldt و همکاران (۲۰۰۹)، با استفاده از پروتئین‌های VP28 و VP19 نسبت به محافظت از میگو در مقابل بیماری اقدام نمودند و نشان دادند با توجه به اینکه امکان استفاده از روش تزریقی امکان‌پذیر نیست؛ بهتر است از روش حمام استفاده گردد. در یک بررسی در محیط طبیعی از طریق روش خنثی‌سازی، واکسیناسیون میگوی ببری سیاه با استفاده از پروتئین VP28 از نوکلئو کپسید میگو انجام گردید و این پروتئین توانست نقش حفاظتی خوبی در برابر

در مطالعه حاضر، افزایش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار حاوی واکسن مشاهده گردید؛ آنزیم پراکسیداز (POD) فاکتور مؤثر دیگر موجود در پلاسما بوده که به شدت به مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم پارتیکل‌های خارجی می‌باشد. POD نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (Liu *et al.*, 2000) و ارگانل‌های پراکسیدازم حاوی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، POD و کاتالاز بوده که می‌توانند موجب حفاظت سلول‌ها از تغییر مواد تغییردهنده سلول‌ها نظیر H_2O_2 ، آب غیر سمی و رادیکال‌های اکسیژن آزاد باشد (Wang *et al.*, 2012).

از دیگر آنزیم‌های مؤثر در واکنش‌های دفاعی و سیستم ایمنی میگوها، آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) بوده که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیر هوازی پدید می‌آید؛ این آنزیم در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. میزان SOD در تحقیق حاضر در تیمار T1 نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$).

نتایج تحقیق Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) و Chang و همکاران (۲۰۰۹) با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی داشته و نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی همچون واکسن، موجب افزایش SOD در میگوی ببری سیاه شده است.

آنزیم دیگری که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل اکسیداز (PO) می‌باشد؛ سیستم پروفنل اکسیداز (proPO) یکی از اجزای سیستم دفاعی میگو می‌باشد؛ این سیستم بالأخص در شناسایی اجزای غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد

اطمینان خاطر در مراکز تکثیر از این واکسن به منظور افزایش سطح ایمنی زایی میگوها استفاده کرد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. افشار نسب، م.، ۱۳۸۶. بیماری ویروسی میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۱۰ صفحه.
۲. افشار نسب، م.، عارف زاده، ع.، مرتضایی، ر.، دشتیان نسب، ع.، جرفی، آ. ۱۳۹۰. مطالعه آسیب‌شناسی و مولکولی سندروم ویروس تورا در میگو پا سفید در ایران. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۸(۱)، ۴۵۹-۴۶۶.
۳. خارا، ح.، محمد زاده و.، قیاسی، م.، رهبر، م.، ۱۳۹۲. بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی (در مزارع پرورشی استان مازندران). مجله توسعه آبی‌پروری، ۷(۲)، ۲۳-۱۷.
۴. صالحی، ح.، ۱۳۸۶. تحلیل اقتصادی تولید میگوی سفید هندی در استان‌های جنوبی ایران. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶(۱)، ۱۱۶-۱۰۳.
۵. محسنی نژاد، ل.، پیغان، ر.، ۱۳۹۵. بررسی تأثیر جیره غذایی بر شمارش تام باکتری‌های روده و مشخصات هیستومتریک روده ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط‌زیست جانوری، ۸(۲)، ۲۳۰-۲۲۳.

ویروس لکه سفید در میگو داشته باشد (Witteveldt et al., 2009). همچنین با استفاده از پروتئین VP19 فقط از طریق تزریقی موجب تحریک سیستم ایمنی شده و باعث تقویت میگو در برابر ویروس لکه سفید گردید (Witteveldt et al., 2009). بررسی صورت گرفته توسط yan همکاران (۲۰۱۰) بر اساس خنثی‌سازی نسبت به تولید واکسن نو ترکیب با استفاده از VP19 علیه ویروس لکه سفید ساخته شده است. بدین منظور یک قطعه از پروتئین VP19 به صورت Sf21 در سلول حشرات توسط سیستم باکیلوویروس و توسط پروتئین‌های متصل‌کننده با هیستون His-tag باند گردید. سپس پلی کولونال آنتی سرم بر علیه rVP19 در خرگوش تولید گردید. مقدار ثابتی از ویروس لکه سفید رقیق شده در غلظت‌های مختلف انکوبه شده و سپس به میگوی چینی تزریق گردید. بعد از ۹ روز از تزریق نمونه‌های شاهد ۱۰۰٪ تلفات در میگوها گزارش گردید. میگوهای که با سرم‌های انکوبه تزریق شده بودند بعد از ۱۵ روزه میزان ۸۵٪ تلفات در آن‌ها مشاهده شد. میگوهای که به ترتیب با دوزهای ۱ میکرو لیتر، ۵ میکرو لیتر و ۱۰ میکرو لیتر تزریق شده بودند به ترتیب ۶۶/۶٪، ۴۰٪ و ۲۶/۶٪ بعد از ۱۵ روز تلفات دادند. این نتایج بیان می‌کند که افزایش میزان آنتی سرم موجب کاهش مرگ‌ومیر در میگوها می‌شود. در سال ۲۰۰۸ نیز yeh و همکاران با استفاده از VP26 و VP28 توانسته‌اند در میگوها علیه ویروس لکه سفید ایمنی ایجاد نمایند.

نتایج این تحقیق نشان داد میگوهای واکسینه شده نسبت به غیر واکسینه (تیمار شاهد)، سیستم ایمنی قوی‌تر و کاراتری دارند و سبب افزایش بازماندگی و فاکتورهای ایمنی آن‌ها شده است؛ بنابراین می‌توان با

15. Huang, P. Y., Kang, S. T., Chen, W. Y., Hsu, T. C., Lo, C. F., Liu, K. F. & Chen, L. L. 2008. Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 250-257.
16. Huant, J., Yang, Y. & Wang, A. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28, 240-244.
17. Johnsona, K. N., van Hultena, M.C.W. and Barnesa, A. C., 2008. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: Phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine*, 26, 4885-4892.
18. 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.
19. Motamedi Sedeh, F., Afsharnasab, M., Heidarieh, M., Shafae, S. K., RAJABIFAR, S., Dashtiannasab, A. & Razavi, M. H. 2012. Titration of the Iranian White Spot Virus isolate, on Crayfish *Astacus leptodactylus* and *Penaeus semisulcatus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11, 145-155.
20. Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K., 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229, 25-35.
21. Pacheco, R., Ascencio, F., Zarain, M., Gómez, G. & Campa, A. 2011. Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1.3 glucan vitamin E, and β -carotene and infected with white spot syndrome virus. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(3), 534-543.
22. Ramos-Carreño, S., Valencia-Yáñez, R., Correa-Sandoval, F., Ruíz-García, N., Díaz-Herrera, F., Giffard-Mena, I., 2014. ۶. مسرور رودسری، م.، رضوانی، م.، خارا، ح. جمال زاد فلاح، ف.، ۱۳۹۱. اثربخشی دوره آموزشی ترویجی بر آگاهی‌های زیست‌محیطی آبزی پروران گیلان. مجله توسعه آبزی‌پروری، ۷۵، (۱) ۸۶-۷۵.
۷. یاراحمدی، آ.، خورشیدیان، ک.، آیین جمشید، خ.، ۱۳۹۵. نگاهی اجمالی به وضعیت تولید میگو در ایران و جهان. مجله میگو و سخت‌پوستان، ۱ (۱)، ۴-۱۱.
8. Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3-11.
9. Chang, P. S., Lo, C. F., Wang, Y. C. & Kou, G. H. 2009. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7, 131-139.
10. Cheng, W., Chieu, H.-T., Tsai, C.-H., Chen, J.-C., 2005. Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology* 19, 375-385.
11. Chen, Y. Y., Chen, J. C., Lin, Y. C., Kitikiew, S., Li, H. F., Bai, J. C., Tseng, K. C., Lin, B. W., Liu, P. C., Shi, Y. Z., Kuo, Y. H. & Chang, Y. H. 2014. Endogenous molecules induced by a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp. *PLoS One*, 17,9(12), e115232
12. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Technical Paper. 500/1, Rome, 105 p.
13. Flegel, T., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 217-231.
14. Hernández-Lopez, J., Golkxs-Galwin, T. & Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C (1), 61-66.

- ultrastructure in gills of *Cherax quadricarinatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32, 645-650.
27. Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten, M.C., 2009. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish & shellfish immunology*, 16, 571-579.
 28. Yan, X., Jie, A., Jing-Qiu, S., Ya-Dong, Y. & Jun-Qiang, Y. 2010. Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 34, 2, 402-409.
 29. Yeh, S. T., Y. C. Lin, C. L. Huang and J. C. Chen, 2008. "White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress." *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5-6): 887-894.
 - White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. *Archives of Virology*, 159, 2213-2222.
 23. Kakoolaki, S., Sharifpour, I., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Mirzargar, S., Rostami, M., 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(2) 219-232.
 24. Tamayo, R.J.M., 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Norwegian College of Fishery Science University of Tromsø, Norway.
 25. Van De Braak, C. B. T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PhD thesis, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Sciences. The Netherlands. Pp.168.
 26. Wang, D. L., Zuo, D., Wang, L. M., Sun, T., Wang, Q. & Zhao, Y. L. 2012. Effects of white spot syndrome virus infection on immuno-enzyme activities and