مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

مقایسه غیر فعال سازی ویروس سندرم لکه سفید میگو به روش پرتوتابی الکترون و تیمار با فرمالین

ف. معتمدی سده[1*]، م. افشارنسب[2]، م. حیدریه[1]، ع. دشتیان نسب[2]، س.ک. شفائی[1] و و. یگانه[2]
۱. پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، صندوق پستی: ۸۳۶-۱۴۳۹۵، تهران، ایران
ایمیل نویسنده مخاطب: fmotamedi@nrcam.org
۲. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵، تهران، ایران

چکیده: ویروس سندرم لکه سفید یکی از عوامل بیماری زای مهم در صنعت پرورش میگو می باشد. این ویروس نه تنها در میگو بلکه در سایر سخت پوستان وجود دارد. نمونه های میگو عفونی از جنوب ایران جمع آوری و از نظر وجود ویروس سندرم لکه سفید با استفاده از آزمون Nested PCR بررسی شد. ویروس از میگو های عفونی شده به روش سانتریفوژ و فیلتراسیون جداسازی و در بدن خرچنگ دراز تکثیر داده شد. این ویروس از همولنف خرچنگ عفونی شده به روش شیب غلظت سوکروز واولتراسانتریفوژ خالص سازی و توسط مشاهده با میکروسکوپ الکترونی تائید گردید. تیتراسیون ویروس (دز کشنده ۵۰ درصد) در میگو ببری سبز انجام شد. غیرفعال سازی ویروس به روش پرتوتابی با استفاده از شتابدهنده الکترون با انرژی 10-Mev و تیمار با فرمالین انجام شد. دز کشنده ۵۰ درصد ویروس زنده و ویروسهای پرتوتابی شده به روش کربر محاسبه و منحنی دز/پایندگی با استفاده از نرم افزار Origin6 ترسیم و فاکتور D_{10} Value محاسبه گردید. تیتر ویروس $10^{5.4}$ LD_{50}/ ml و دز اپتی مم الکترون برای غیرفعال سازی این ویروس ۱۳ کیلوگری بدست آمد. این آنتی ژن ویروسی پرتوتابی شده می تواند در آینده برای ارزیابی سیستم ایمنی میگو مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ویروس سندرم لکه سفید، میگو، پرتوتابی الکترون، غیرفعال سازی، فرمالین، واکسن

Comparison of White Spot Syndrome Virus inactivation by electron irradiation and formalin treatment

F.Motamedi-Sedeh[1*], M. Afsharnasab[2], M. Heidareih[1], A. Dashtiannsab[2], S.K. Shafaei[1] and V. Yganeh[2]
1. Nuclear Science and Technology Research Institute, P.O.BOX: 14395-836, Tehran, Iran
Corresponding Author email: fmotamedi@nrcam.org
2.Fisheris Science Research Institute, P.O.BOX: 14155-6116, , Tehran, Iran

Abstract: White spot syndrome virus is a major economic important pathogen for cultured penaeid shrimp industries. The virus is not only present in shrimp but also occurs in marine crustaceans. The infected shrimp samples were collected from south of Iran and was confirmed by Nested PCR. WSSV was isolated from infected samples by centrifugation and filtration and multiplied in crayfish by intramuscular inoculation. WSSV was purified from the infected crayfish haemolymph by sucrose gradient and ultracentrifuge, and then confirmed under electron Microscopy. In vivo virus titration was performed in *Penaeus semiculcatus* in a period 8-10 days, and calculated as LD_{50}. Inactivation of WSSV was carried out by the10-Mev electron accelerator and formalin treatment. The LD_{50} of the live virus and the irradiated virus samples were calculated by Karber method. The dose survival curve for irradiated and non-irradiated virus samples was drawn by Origin6 software and D_{10} Value factor was calculated according to the equation of fitted line. In vivo titration of the live virus stock was obtained $10^{5.4}$ LD_{50}/ ml

and the optimum dose of electron beam for inactivation of WSSV was obtained 13 kGy. The inactivated, irradiated WSSV antigen can use for evaluation of shrimp immune system in the next future.

Keywords: White spot syndrome virus, Electron Irradiation, Inactivation, Formalin, Vaccine

مقدمه:

ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) در تمام همولنف میگوی عفونی شده در حال گردش می باشد. این ویریون دارای یک نوکلئوکپسید میله ای شکل، به قطر ۶۵-۷۰ نانومتر و طول ۳۰۰-۳۵۰ نانومتر و یک پوشش لیپیدی می باشد [۱، ۲ و ۳]. این ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته ای بزرگ حدود ۲۹۰ کیلو جفت باز (kbp) می باشد [۴]. همانطور که لایتنر در سال ۱۹۹۶ گزارش نمود این ویروس در دمای C ° ۵۰ به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای C ° ۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال می گردد. بسیاری مواد شیمیایی مثل کلرید سدیم ۱۵٪ در دمای C ° ۲۸ به مدت ۲۴ ساعت، اوزن باقیمانده ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، عوامل اکسید کننده و اتر نیز بر این ویروس موثرند. ایده واکسیناسیون میگو یا سایر سخت پوستان علیه این ویروس به نظر می رسید عملی نباشد چون تصور می شد که این موجودات فاقد پاسخ ایمنی اکتسابی باشند و فقط پاسخ ایمنی ذاتی دارند [۵]. هر چند که در مطالعات اخیر دیده شده که ماکروسیکلوپوس آلبیدوس که از پاروپایان می باشد دارای سیستم دفاعی است که باعث شده این سخت پوست واکنش ایمنی کارامدتری در برخورد با یک آنتی ژن انگلی که قبلاً با آن برخورد داشته نشان دهد، لذا شاید ایمنی خاطره وجود داشته باشد [۶]. بعدها مشخص شد که تحریک ایمنی و واکسیناسیون میگو با ویبریو غیرفعال شده تا حدودی باعث حفاظت در مقابل این ویروس می شود [۷]. بیماری سندرم لکه سفید یکی از بیماریهای جهانی میگو می باشد که در سایر سخت پوستانی مثل خرچنگ نعل اسبی و خرچنگ دراز دیده می شود [۸و ۹]. در مزارع پرورشی میگو انتقال این ویروس می تواند توسط آب و غذای آلوده انجام شود [۱۰]. هدف اصلی از این مطالعه مقایسه غیرفعال سازی ویروس سندروم لکه سفید به روش پرتوتابی الکترون و تیمار با فرمالین به منظور تهیه آنتی ژن اولیه برای تولید واکسن غیرفعال علیه این بیماری می باشد.

مواد و روش ها:

نمونه گیری: نمونه های میگو آلوده به ویروس لکه سفید با علائم بیماری از مزارع پرورشی میگو جنوب، استان بوشهر جمع آوری شدند و به روش Nested RT-PCR با استفاده از کیت IQ 2000 از نظر وجود ویروس بیماری زا مورد بررسی قرار گرفتند [۱۱].

جداسازی ویروس WSSV و تکثیر آن در خرچنگ دراز: بافت نمونه های میگو عفونی شده پس از خرد شدن در بافر TN (Tris-HCl 20 mM, NaCl 400 mM, pH 7.4) به نسبت ۱ به ۵ هموژن شدند، سپس با دور g ×۱۷۰۰ به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۴ ° C سانتریفوژ گردیده، سوسپانسیون بالای جداسازی و پس از چند بار عبور از کاغذ واتمن و فیلتر ۰/۴۵ میکرون برای تزریق به خرچنگ مورد استفاده قرار گرفت. خرچنگ های دراز Astacus Leptodactylus از رودخانه ارس در شمال غربی ایران جمع آوری و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان در پژوهشکده کشاورزی هسته ای کرج انتقال داده شدند. سوسپانسیون ویروسی به روش داخل عضلانی در بند سوم یا چهارم شکمی خرچنگ تزریق و خرچنگ ها در دمای ۳۰ ° C نگهداری شدند. بعد از ۴-۵ روز همولنف خرچنگ ها همراه با ماده ضد انعقاد کشیده و در فریزر ۷۰ ° C- به عنوان استوک ویروسی نگهداری شد[۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵].

خالص سازی ویروس WSSV و مطالعه با میکروسکوپ الکترونی: همولنف جمع آوری شده از خرچنگ های آلوده به ویروس برای خالص سازی ویروس توسط گرادیانت سوکروز و اولتراسانتریفوژ بکمن مدل L2-65 B با دور g ×۱۱۲۴۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ ° C مورد استفاده قرار گرفتند. رسوب حاصل از مرحله اول اولتراسانتریفوژ بر روی لوله حاوی شیب غلظت سوکروز از ۱۵ تا ۴۵ درصد به آرامی قرار داده و سپس اولتراسانتریفوژ با دور g ×۱۵۳۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ ° C انجام شد. باند ویروسی قابل مشاهد جداسازی و جمع آوری گردید [۱۶ و ۱۷]. یک قطره از این ویروس خالص شده بر روی یک گرید مسی پوشش داده شده با فیلم فورموار قرارداده شده و توسط میکروسکوپ الکترونی ZEISS – EM-900, 80 KV به روش رنگ آمیزی منفی با فسفوتنگستیک اسید ۲ درصد مشاهده گردید [۱۸].

تیتراسیون ویروس در میگو ببری سبز *(Penaeus semiculcatus)*: سریال رقت ۱۰ تا 10^{5} از استوک ویروسی تهیه شده از همولنف خرچنگ ها در بافر فسفات استریل تهیه و به بچه میگوهای با وزن ۱-۲ گرم تزریق گردید. از هر رقت ۱۰ میکرولیتر به صورت درون ماهیچه ای به یک گروه ۱۴ تائی بچه میگو و به یک گروه از بچه میگوها بافر فسفات استریل به عنوان کنترل منفی تزریق شد. تمام میگوهای گروه کنترل منفی زنده ماندند در حالیکه در همه رقت های مختلف مرگ و میر ناشی از عفونت ویروسی اتفاق افتاد [۱۳، ۱۵ و۱۹]. میگوهای مرده از نظر وجود ویروس توسط کیت تجاری IQ Nested PCR - 2000 kit بررسی شدند.

پرتوتابی با استفاده از شتابدهنده الکترون: پرتوتابی با استفاده از شتابدهنده الکترونی با انرژی ۱۰ مگا الکترون ولت و جریان ۲ میلی آمپر (IBA Company, Model Rodotron TT200) انجام شد. نمونه های ویروسی در حالت منجمد و با دزهای ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوگری الکترون (سه نمونه ویروسی برای هر دز پرتوتابی) پرتوتابی شدند.

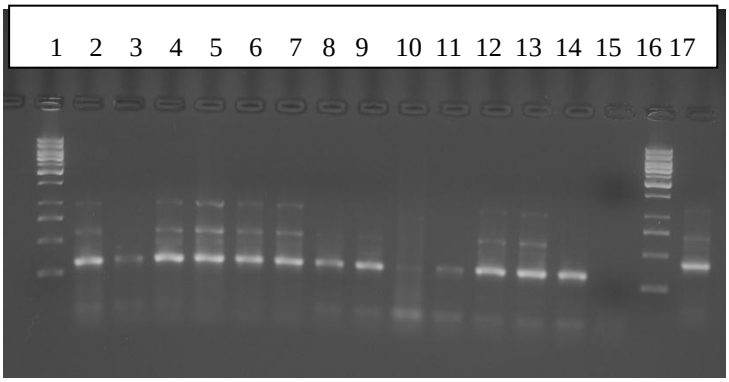
ویروس لکه سفید غیرفعال شده توسط فرمالین: همولنف خرچنگ دراز عفونی شده به عنوان سوسپانسیون ویروسی با فرمالین به میزان ۰/۵٪ حجمی/حجمی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ ° C نگهداری شد. با استفاده از سانتریفوژ

g×۳۰۰۰۰ به مدت یک ساعت در دمای C ° ۴ فرمالین اضافی از محیط خارج و رسوب حاصل در حداقل حجم بافر فسفات استریل حل شده و به عنوان واکسن غیرفعال فرمالینه استفاده گردید [۱۳].

آزمون بی ضرری (Safety test): هر گروه میگوی ببری سبز حاوی ۱۰ عدد میگو با ویروس پرتوتابی شده با دز اپتی مم الکترون به روش حمامی تیمار شدند. همچنین سریال رقت ۱۰ تا $^{-3}$ ۱۰ از نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون در بافر TN تهیه جهت تعیین تیتر ویروس پرتوتابی شده به بچه میگوها به صورت درون عضلانی تزریق شد. سریال رقت ۱۰ تا $^{-3}$ ۱۰ از نمونه ویروسی غیرفعال شده با فرمالین نیز تهیه شده و جهت تعیین تیتر ویروس فرمالینه به بچه میگوها تزریق شد.

نتایج:

نمونه های میگو عفونی شده: نمونه های میگو عفونی شده از نظر وجود ویروس لکه سفید با استفاده از کیت تجاری IQ 2000 kit به روش Nested PCR مورد تائید قرار گرفتند که نتایج واکنش پی سی آر در شکل ۱ دیده می شود.



شکل ۱: نتیجه واکنش Nested RT-PCR نمونه های میگو عفونی شده، ستون ۱۷ کنترل مثبت (۳۳۳، ۶۳۰ و ۸۴۸ جفت باز)، نمونه های مثبت ستون های: ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ ، کنترل منفی در ستون ۱۵و ستون های ۱ و ۱۶ مارکر DNA

تیتراسیون ویروس: دز کشنده ۵۰ (LD_{50}) درصد استوک ویروسی زنده به روش کربر محاسبه گردید. به طور خلاصه مرگ و میر میگوها در هر گروه از رقتهای مختلف ویروس در جدول ۱ ثبت شده است و دز کشنده ۵۰ درصد حدود ^{۵,۴} ۱۰ در میلی لیتر محاسبه شد [۲۰].

جدول ۱: میزان مرگ میگوها در هر رقت از نمونه ویروسی زنده

رقت	تعدا کل در هر گروه	تعداد مرده	تعداد زنده/ تعداد مرده	کسر (p)
$۱۰^{۰}$	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۱}$	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
$۱۰^{-۲}$	۱۲	۱۰	۱۰/۱۲	۰/۸۳
$۱۰^{-۳}$	۱۲	۱۱	۱۱/۱۲	۰/۹۱۶
$۱۰^{-۴}$	۱۲	۲	۲/۱۲	۰/۱۶
$۱۰^{-۵}$	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

فرمول کربر:

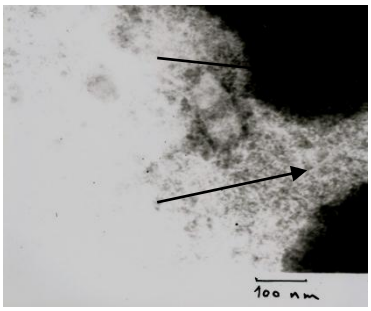
$$\textbf{-Log } LD_{50} = X^a - D\,(Sp - 0.5)$$

$$-\text{Log } LD_{50} = X^a - D\,(Sp - 0.5) = -1\text{-}1\,(2.906\text{-}0.5) = -3.406$$

$$LD_{50} = 10^{3.4} / 0.01 \text{ ml} = 10^{5.4} / \text{ml}$$

X^a آخرین رقتی که تمام نمونه ها عفونی باشند. D لگاریتم فاکتور رقت، P کسر رقتهای ویروسی عفونی شده و Sp جمع کسرهای P بین آخرین رقتی که همه نمونه ها مثبت باشند (p=1) و اولین رقتی که همه نمونه ها منفی باشند (p=0).

عکس ویروس لکه سفید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: ویریون های ویروس لکه سفید به روش اولتراسانتریفوژ از همولنف خرچنگ دراز جمع آوری شدند و به روش رنگ آمیزی منفی و توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی



گردیدند

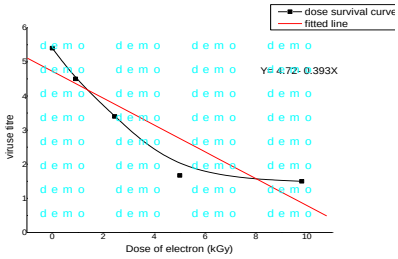
شکل ۲: عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری از ویروس لکه سفید (بزرگنمائی ۱۴۰۰۰۰)

آزمون بی ضرری: دز کشنده ۵۰ درصد از نمونه های ویروسی پرتوتابی شده توسط الکترون به روش کربر محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۲ مشاهده می شود. همچنین در شکل ۳ منحنی دز/ پایندگی نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون مشاهده می شود. مطابق با نتایج جدول ۲ و خط منطبق شده بر روی منحنی ، تیتراسیون ویروس همراه با افزایش دز پرتوتابی کم کم کاهش می یابد. همچنین فاکتور D_{10} (دز پرتوتابی الکترون که ۹۰٪ تیتر ویروسی را کاهش می دهد.) حدود ۲/۰۷ کیلوگری محاسبه گردید. دز اپتی مم الکترون برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید با تیتر $10^{5,4}$ در میلی لیتر حدود ۱۲-۱۳ کیلوگری محاسبه گردید.

جدول ۲: دز کشنده ۵۰ درصد از نمونه های ویروسی پرتوتابی شده توسط الکترون

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

ویروس لکه سفید غیرفعال شده با فرمالین: دز کشنده ۵۰ درصد نمونه ویروسی غیرفعال شده با فرمالین به روش کربر حدود $10^{1,5}$ محاسبه گردید.



شکل ۳: منحنی دز/ پایندگی نمونه های ویروس لکه سفید پرتوتابی شده با الکترون

بحث:

تهیه و تولید واکسن های غیرفعال از طریق تیمار باکتری ها و ویروس های بیماری زا با پرتوهای یون ساز گزارش شده است. پرتوهای ایکس و گاما با خواص الکترومغناطیسی، طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد، بدون ایجاد خواص رادیواکتیو در موادی که تحت تیمار قرار می دهند، جهت پرتوتابی به منظور غیرفعال سازی میکروارگانیسم ها استفاده می شوند. مطالعه ویروسهای حیوانی نشان داده که عفونت زائی ویروس ها ممکن است به طور انتخابی توسط پرتوتابی تخریب گردد ولی خواص آنتی ژنیک آنها می تواند دست نخورده باقی بماند [۲۱]. پرتوتابی ویروس ها باپرتوهای یون ساز توسط محققینی از جمله: پولارد [۲۲]، گینوزا [۲۳]، مطالعه شده است. اسمولکو و لمباردو در سال ۲۰۰۵ از روش پرتوتابی گاما برای غیرفعال سازی نسبی و کامل ویروس تب برفکی، راچر لوکمیا ویروس و هرپس سیمپلک ویروس استفاده نمودند [۲۴ و ۲۵]. همچنین معتمدی و همکاران در مورد واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی تایپ A87/IRN بدون تغییر خواص آنتی ژنیکی آن به روش پرتوتابی گاما مطالعاتی انجام دادند [۲۶]. نامیکاشی و همکارانش ویروس لکه سفید میگو را توسط فرمالین (۰/۵٪) غیرفعال نموده و به عنوان واکسن غیرفعال شده استفاده کردند، همچنین ویروس WSSV غیرفعال شده با حرارت ۶۰ C° به مدت ۱۰ دقیقه را برای تهیه واکسن غیرفعال شده بکار بردند [۱۰]. پرس و همکارانش در سال ۱۹۹۷ سه مدل ویروسی متفاوت (پاروویروس خوکی، اینتروویروس خوکی و ویروس عامل اسهال گاوی) را توسط بیم الکترون پرتوتابی نمودند. آنها گزارش کردند که فاکتور D_{10} نمونه های ویروسی پرتوتابی شده در حالت مایع بین ۵۱ تا ۶۹ درصد ارزش آن در حالت منجمد می باشد، این بدین معنی است که دز بالاتر پرتو برای غیر فعال سازی همان مقدار ویروس وقتی در حالت منجمد باشد لازم است [۲۷]. در این تحقیق رنج دز اپتی مم برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید میگو جداسازی شده از ایران با نتایج آزمون بی ضرری مناسب حدود ۱۲ تا ۱۳ کیلوگری بدست آمد. همچنین غیرفعال سازی ویروس با فرمالین نیز انجام گردید، ولی فرمالین باعث ایجاد باقیمانده سمی در محصول خواهد شد. اگر ویروس لکه سفید غیرفعال شده توسط پرتوتابی بدون تغییرات نامطلوب در خواص آنتی ژنیک باشد می تواند در آزمون مواجهه با ویروس زنده در میگو زنده در تحقیقات آتی استفاده شود.

منابع:

1. MC. W. van Hulten, J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. Klein Lankhorst, and J. M. Vlak. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virolog*, 286: 7-22, (2001).
2. S. Durand, D. V. Lightner, R. M. Redman, J. R. Bonami. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis Aquat Org*, 29: 205-211 (1997)..
3. E. C. Nadala, L. M. Tapay, P. C. Loh. Characterization of a non- occluded baculovirus- like agent pathogenic penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 33: 221- 229 (1998).
4. F. Yang, W. Wang, R. Z. Chen, and X. Xu. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J Virol Methods*, 67: 1-4 (1997).
5. Kimbrell, D. A. and, B. Beutler. The evolution and genetics of innate immunity. Nat. Rev. Gen. 2:256-267 (2001).
6. Kurtz, J. and Franz, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. Nature, 425, 37–38 (2003).

7. Alabi,A.O., Jones,D.A. andLatchford,J.W.The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of Penaeus indicuslarvae against Vibrio harveyi. Aquaculture, 178: 1–11 (1999).
8. H. H. Shih. Neutralization of White Spot Syndrome Virus by monoclonal antibodies against viral envelope protein. Taiwania, 49(3): 159-165 (2004).
9. T. W. Flegel. Major Viral Diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microbiol and Biotechnol*, 13: 433- 442 (1997).
10. A. Namikoshi, J. L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T, Nishioka, M. Arimoto and K. Muroga. Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229: 25- 35 (2004).
11. M.Afsharnasab, A. Dashtyannasab. V. Yeganeh and M. Soltani. Incidence of white spot disease (WSD) in Penaeus indicus farms in Bushehr Province, Iran. *Fisheries Sciences*, 7 (1): 15-26 (2007).
12. MC. W. van Hulten, J. Witteveldt, M. Snippe and J. M. Valk. White Spot Syndrom Virus Envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Vorilogy*, 285, 228-233 (2001).
13. H. Du, Z. Xu, x. Wu, W. Li and W. Dai. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. *Aquaculture*, 260: 39-43 (2006).
14. J. Witteveldt, C. C. Cifuentes, J. M. Valk and MC. W. van Hulten. Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus by Oral vaccination. *J Virol*, 78 (4): 2057-2061 (2004).
15. J. Witteveldt, J. M. Valk and MC. W. van Hulten. Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish & Shelfish Immunol*, 16: 571-579 (2004).
16. B. T. Poulos, C. R. Pantoja, D. Bradley- Dunlop, J. Aguilar and D. V. Lightner. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of White spot syndrome virus of Penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 47: 13-23 (2001).
17. MC. W. van Hulten, M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Valk. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gene Virology*, 81: 307-316 (2000).
18. Y. T. Wang, W. Liu, J. N. Seah, C. S. Lam, J. H. Xiang, V.Korzh, J. Kwang. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguiensis*. *Dis Aquat Org*, 52: 249- 259 (2002).
19. J. Witteveldt, C. C. Cifuentes, J. M. Valk and MC. W. van Hulten. Protection of Penaeus monodon against White Spot Syndrom Virus by Oral vaccination. *J Virol*, 78 (4): 2057-2061 (2004).
20. Karber (2002). FMD, Karber formula for calculation of virus/ antibody titres. OIE A Manual, Overview.
21. H. R. Morton Reitman, JR. Tribble, and L. Green. Gamma-Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis Vaccines. *Applied Microbiolo*, May: 763- 767 (1970).
22. E. Pollard. The action of ionizing radiation on viruses. *Advan Virus Res*, 2: 109-151 (1955).
23. W. Ginoza. Inactivation viruses by ionizing radiation and heat. In Methods in virology, vol. IV, Chap. 4: 139-209, Academic Press, N. Y. (1968).
24. E. E. smolko, J. H. Lombardo. Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B 236: 249- 253 (2005).
25. J. H. Lombardo and E. E. Smolko. A Biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci. *Radiat. Phys. Chem*, 35 (4-6): 585-589 (1990).
26. F. Motamedi Sedeh, A. Khorasani, K. Shafaee, H. Fatolahi and K. Arbabi. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig. *Indian J Microbiol*, 48 (3): 326- 330 (2008).

27. T. Preuss, S. Kamstrup, N. C. Kyvsgaard, P. Nansen, A. Miler and J. C. Lei. Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum. *Clin Diagno Labo Immuno*, 4(5): 504-508 (1997).

.