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)

بررسی کاهش لگاریتمی تیتر ویروس عامل سندرم لکه سفید پرتوتابی شده

ف. معتمدی سده[۱*]، م. افشارنسب[۲]، م. حیدریه[۱]، ع. دشتیان نسب[۲]، س.ک. شفائی[۱] و و. یگانه[۲]
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 عامل سندرم لکه سفید در جنس ویسپوویروس، خانواده نیماویریده قرار دارد. این ویروس نه تنها میگو بلکه سایر سخت‌پوستان دریایی و آب شیرین را عفونی می‌سازد. به منظور انجام آزمایش، میگوهای عفونی شده با این ویروس از جنوب کشور جمع‌آوری و به روش پی سی آر عفونت ویروسی آنها تائید گردیدند. تیتر ویروس زنده در میگو گونه وانامی به روش کربر تعیین و دز کشنده ۵۰ درصد $۱۰^{۵,۴}$ در هر میلی‌لیتر بدست آمد. در مرحله بعد به منظور کاهش عفونت‌زایی ویروس دزهای ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ کیلوگری (پرتو گاما) به منظور پرتودهی نمونه‌های ویروسی منجمد استفاده گردید. تیتر ویروسی با افزایش دز پرتوتابی کاهش معنی‌داری را نشان داد. نهایتاً براساس نتایج حاصل از پرتوتابی ویروس با دزهای مختلف پرتو گاما فاکتور D_{10} (دز پرتو گاما که توانایی کاهش یک سیکل لگاریتمی از تیتر ویروسی را دارد) ۲/۴ کیلوگری برای ویروس لکه سفید با تیتر $۱۰^{۵,۴}$ در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

واژگان کلیدی: ویروس سندرم لکه سفید، پرتوتابی، خرچنگ دراز، کاهش لگاریتمی، پی سی آر

Study of logarithmic reduction in irradiated White spot syndrome virus titre

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 (WSSV) has been placed in *Whispovirus genus*, *Nimaviridae* family; it cannot infect only shrimp but also other marine and freshwater crustaceans**.** At this study**,** the infected shrimp samples were collected from south of Iran and was confirmed by Nested PCR. In vivo virus titration was performed in *Litopenaeus vannamei*. The titre of live virus stock, calculated by Karber method, was calculated $10^{5.4}$ / ml. Different doses of gamma ray consist of 1, 3, 5, 10, 20, 25, 30, and 35 kGy were used for irradiation of frozen virus samples. The virus titer was decreased gradually by increasing of gamma ray doses ($P<0.05$). Finally, the D_{10} value factor (dose of gamma ray which can decrease one logarithmic cycle of virus population) was obtained 2.4 kGy.

Keywords: White Spot Syndrome Virus, Irradiation, Crayfish, Logarithmic reduction, PCR

مقدمه: ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) یکی از عوامل بیماری زائی مهم در صنعت پرورش میگو می باشد. این ویروس نه تنها در میگو بلکه در سایر سخت پوستان آبزی از جمله خرچنگ دراز و خرچنگ نعل اسبی وجود دارد [۱]. در مزارع پرورشی میگو عفونت این ویروس می تواند باعث ۱۰۰٪ مرگ و میر در عرض ۳-۱۰ روز گردد و زیان های اقتصادی زیادی به صنعت پرورش میگو وارد نماید. اولین گزارش در سال ۱۹۹۱ در تایوان بود که این ویروس سریعاً در مزارع پرورشی میگو انتشار یافت و به سایر مزارع پرورشی در کشورهای آسیای شرقی نیز سرایت نمود [۱]. این بیماری توسط یک ویروس دارای ژنوم DNA دورشته ای (۲۹۰ کیلو جفت باز) و باسیلی شکل که دارای نوکلئوکپسید میله ای و یک زائده دمی می باشد ایجاد می شود. قطر ویروس ۶۵-۷۰ نانومتر و طولش ۳۰۰-۳۵۰ نانومتر می باشد. از نظر ژنتیکی این ویروس در جنس ویسپوویروس قرار دارد [۲، ۳ و ۴].

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 [۵].

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 C ° ۴ 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 C ° ۳۰ نگهداری شدند. بعد از ۴-۵ روز همولنف خرچنگ ها همراه با ماده ضد انعقاد کشیده و در فریزر C ° ۷۰- به عنوان استوک ویروسی نگهداری شد[۲، ۶، ۷ و ۸].

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 C ° ۴ 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 C ° ۴ انجام شد. باند ویروسی قابل مشاهد جداسازی و جمع آوری گردید [۹ و ۱۰]. 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 [۱۱].

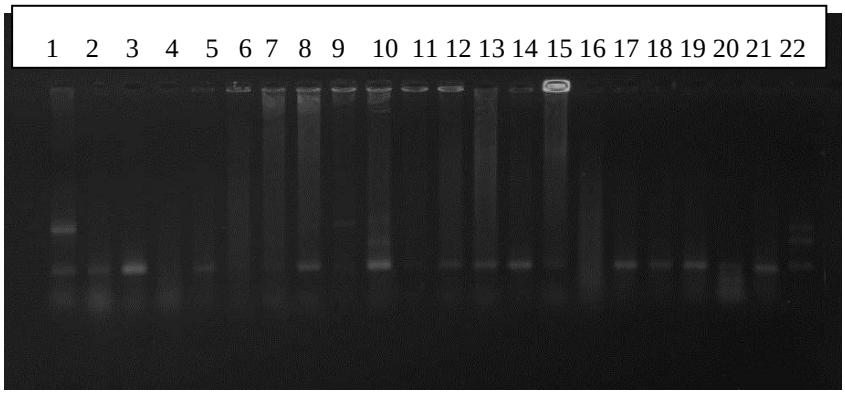
تیتراسیون ویروس در میگو ببری سبز *(Penaeus semiculcatus)*: سریال رقت 10^{-1} تا 10^{-5} از استوک ویروسی تهیه شده از همولنف خرچنگ ها در بافر فسفات استریل تهیه و به بچه میگوهای با وزن ۱-۲ گرم تزریق گردید. از هر رقت ۱۰ میکرولیتر به صورت درون ماهیچه ای به یک گروه ۱۴ تائی بچه میگو و به یک گروه از بچه میگوها 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 . میگوهای مرده از نظر وجود ویروس توسط کیت تجاری IQ 2000 kit - Nested PCR بررسی شدند. تیتر ویروسی با استفاده از فرمول کربر محاسبه گردید [۱۲].

پرتوتابی گاما: پس از تائید بیماری زائی استوک ویروسی جمع آوری شده از همولنف خرچنگ ها، پرتوتابی توسط دستگاه گاما سل شرکت نوردین کانادا مدل ۲۲۰ با نرخ دزی ۴/۸ گری بر ثانیه و اکتیویته ۲۰۴۶۹ کوری به منظور غیرفعال سازی ویروس انجام شد. دزهای پرتوتابی گاما شامل: ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ کیلوگری و برای هر دز ۳ نمونه ویروسی در حالت منجمد پرتوتابی شد.

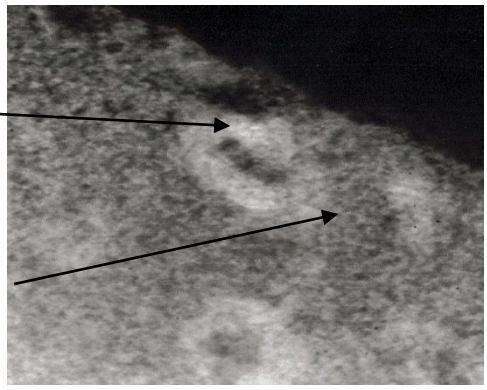
آزمون بی ضرری (سنجش زیستی بعد از پرتوتابی): سه گروه میگو ببری سبز ، هر گروه حاوی ۱۰ عدد میگو با ویروس پرتوتابی شده به روش حمامی تیمار شدند. همچنین سریال رقت 10^{-1} تا 10^{-3} نمونه های ویروسی پرتوتابی شده با دزهای مختلف در بافر TN استریل تهیه شده جهت تعیین تیتر ویروسی در هر دز پرتوتابی به گروههای میگو یک گرمی به صورت درون عضلانی تزریق شدند.

نتایج:

تائید میگوهای 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. همچنین ویرون های WSSV جمع آوری شده از همولنف خرچنگ که اولتراسانتریفوژ شده بود برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی عبوری به روش رنگ آمیزی منفی استفاده شدند (شکل ۲).



شکل ۱: نتیجه واکنش Nested-PCR نمونه های میگو عفونی شده، ستون ۲۲ کنترل مثبت، ستون های ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱ نمونه های مثبت و ستون های ۴، ۶، ۷ و ۱۶ کنترل منفی می باشند.



شکل ۲: عکس ذره ویروس لکه سفید با میکروسکوپ الکترونی (بزرگنمائی ۱۴۰۰۰۰)

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 $10^{5,4}$ در میلی لیتر محاسبه شد.

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)
10^{0}	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
10^{-1}	۱۲	۱۲	۱۲/۱۲	۱
10^{-2}	۱۲	۱۰	۱۰/۱۲	۰/۸۳
10^{-3}	۱۲	۱۱	۱۱/۱۲	۰/۹۱۶
10^{-4}	۱۲	۲	۲/۱۲	۰/۱۶
10^{-5}	۱۲	۰	۰/۱۲	۰

فرمول کربر:

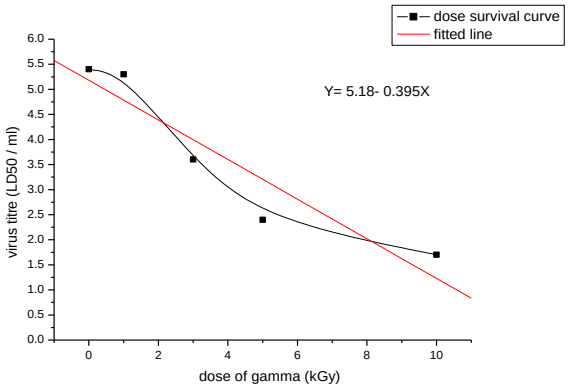
$$\textbf{-Log } LD_{50} = X^a - D\,(Sp - 0.5)$$

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

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

X^a آخرین رقتی که تمام نمونه ها عفونی باشند. D لگاریتم فاکتور رقت، P کسر رقتهای ویروسی عفونی شـده 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).

آزمون بی ضرری: دز کشنده ۵۰ درصد از نمونه های ویروسی پرتوتابی شده توسط پرتو گاما 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 پرتو گاما 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 گاما که ۹۰٪ تیتر ویروسی را کاهش می دهد.) حدود ۲/۴ کیلوگری محاسبه گردید. دز اپتی مم گاما برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید با تیتر $10^{5,4}$ در میلی لیتر حدود ۱۴-۱۵کیلوگری محاسبه گردید.



شکل ۲: منحنی دز/ پایندگی ویروس WSSV پرتوتابی شده با پرتو گاما

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

دز پرتوتابی گاما (کیلوگری)	۰	۱	۳	۵	۱۰	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵
دز کشنده ۵۰ درصد در میلی لیتر	$10^{5,4}$	$10^{5,3}$	$10^{3,6}$	$10^{2,4}$	$10^{1,7}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$

بحث:

تهیه و تولید واکسن های غیرفعال از طریق تیمار باکتری ها و ویروس های بیماری زا با پرتوهای یون ساز گزارش شده است [۱۳]. 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 و باکتری ها 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 [۱۳، ۱۴ و ۱۵]. 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 [۱۶ و ۱۷]. 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 [۱۸]. 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 [۱۹]. در این تحقیق رنج دز اپتی مم پرتو گاما برای غیرفعال سازی کامل ویروس لکه سفید میگو ۱۴-۱۵ کیلوگری بدست آمد. اگر خواص آنتی ژنیک ویریون WSSV پرتوتابی شده با پرتو گاما بعد از پرتوتابی دست نخورده باقی بماند، این ذرات ویروسی می توانند برای تهیه واکسن غیرفعال این بیماری در آینده مورد استفاده قرار بگیرند و به عنوان رادیوواکسن معرفی شوند که البته نیار به بررسی در میگوهای زنده دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناورزی سازمان بخاطر حمایت پروژه اعلام می نمایند. همچنین از آقایان دکتر عباس مجدآبادی، دکتر همایون مهروانی، دکتر آئین جمشید و دکتر یحیی زاده و خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی تشکر می نمایند.

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. 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).
3. MC. W. van Hulten, M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou and J. M. Valk, (2000b). Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J. Gen. Virol*, 81, 307-316 (2000).
4. M. F. Tsai, H. T. Yu, H. F. Tzeng, J. H. Leu, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, G. H. Kou, and C. F. Lo. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virolog*, 277: 100-110 (2000).
5. 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).

6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. Karber. FMD, Karber formula for calculation of virus/ antibody titres. OIE A Manual, Overview (2002).
13. H. R. Morton Reitman, JR. Tribble, and L. Green. Gamma-Irradiated Venezuelan Equine Encephalitis Vaccines. *Applied Microbiolo*, May: 763- 767 (1970).
14. E. Pollard. The action of ionizing radiation on viruses. *Advan Virus Res*, 2: 109-151 (1955).
15. W. Ginoza. Inactivation viruses by ionizing radiation and heat. In Methods in virology, vol. IV, Chap. 4: 139-209, Academic Press, N. Y (1968).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).