مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۴، ۳۹۹ - ۳۹۳

بررسی آلودگی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان ایرانی و خارجی به ویروس‌های نکروز عفونی مراکز خون ساز، سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی و نکروز عفونی لوزالمعده: یک مطالعه مقطعی

فیروز فدایی فرد [۱*] مهدی رئیسی [۱] منوچهر مومنی [۲] مصطفی فغانی [۳]

۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ، شهرکرد- ایران.
۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.
(دریافت مقاله: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۱۳ شهریور ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماریهای نکروز عفونی مراکز خون ساز (IHN)، سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS) و نکروز عفونی لوزالمعده (IPN) از جمله بیماریهای ویروسی مهم آزاد ماهیان پرورشی به‌شمار می روند که منجر به بروز تلفات گسترده در بین آنها می شوند. **هدف:** تحقیق حاضر با هدف بررسی وضعیت آلودگی ویروس های فوق در تخم های چشم زده ایرانی و خارجی و میزان پراکنش این ویروس ها در بین مزارع تکثیر استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. **روش کار:** از این روسه شهرستان فارسان، کوهرنگ و لردگان انتخاب و در هرشهرستان نمونه گیری از سه مرکز تکثیر صورت پذیرفت. از هر مزرعه نیز به طور تصادفی ۲۰ عدد تخم (سبز یا چشم زده) برداشت نموده و با قرار دادن در لوله های درب دار استریل، پس از ثبت برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، جهت ردیابی مولکولی ویروس های فوق با تست Reverse Transcriptase-PCR به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ارسال شد. **نتایج:** طی این تحقیق ۲۳/۳ ٪ تخم های مورد مطالعه آلوده و ۷۶/۷٪ آنها غیرآلوده بود. میزان آلودگی نیز در ویروس های IPN، IHN و VHS به ترتیب ۱۰،۱۲/۵ و ۰/۸۳٪ بود. شهرستان فارسان با ۱۹/۱۵٪ بیشترین و شهرستان های لردگان و کوهرنگ با ۳/۳۳ و ۰/۸۳٪ کمترین میزان آلودگی را در بین مناطق مورد بررسی به خود اختصاص داده اند. همچنین در مقایسه میزان آلودگی تخم ها بر اساس منبع ایرانی یا خارجی بودن آنها، میزان آلودگی در تخم های ایرانی ۲۰٪ و در تخم های خارجی ۳/۳۳٪ بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتیجه کلی تحقیق حاضر نشان از آلودگی نسبی تخم های چشم زده قزل آلای رنگین کمان به ویروس های بیماریزای فوق و توجه به اهمیت همه گیرشناختی آن در بین مزارع پرورشی آن استان و سایر استان های کشور دارد.

واژه‌های کلیدی: IHN، IPN، VHS، تخم چشم زده، چهارمحال و بختیاری.

مقدمه

از جمله تلفات و بیماریهای مشکوک ویروسی شایع در بین ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان می توان به سه بیماری IHN، IPN و VHS اشاره نمود. این بیماریها معمولاً با چهره شاخص کلینیکی و بروز تلفات همه گیر عموماً در بچه ماهیان سنین پایین و دوره انگشت قدی مشاهده می شوند ولی در سنین بالاتر باقی مانده‌ها نقش حامل ویروس را بر عهده دارند و البته در برخورد با این عوامل ویروسی مناسب ترین و شناخته شده ترین راه حل پیشگیری است (۱۲).

بیماری نکروز عفونی مراکز خونساز (IHN) یک بیماری ویروسی ناشی از رابدو ویروس ها است که از بیماریهای مهم آزاد ماهیان بالاخص قزل‌آلای رنگین‌کمان به شمار می رود و بسته به اندازه ماهیان، سویه ویروس و شرایط محیطی مثل دما و میزان شیوع بیماری امکان تلفات تا ۱۰۰٪ در بین ماهیان وجود دارد. بیماری در دمای بالاتر یا در ماهیان درشت ترشکل مزمن به خود می گیرد. تنها راه اجتناب از ویروس بیماریزای IHN، ضدعفونی تخم های وارد شده به مزرعه با ترکیبات ید دار، استفاده از منابع آب بدون پاتوژن در مزرعه ورعایت اصول دقیق بهداشتی در هچری هاست (۷). وقوع بیماری IHN در ایران و شناسایی آن در تخم و بچه ماهیان قزل‌آلا توسط برخی محققین گزارش شده است (۲،۶،۱۰،۱۷). بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده (VHS) نیز با عامل رابدوویروسی موجب تلفات بالا در آزاد ماهیان می گردد این ویروس در اکثر مناطق اروپا به صورت اندمیک در آمده است. ویروس VHS یکی از پاتوژن های مهم مزارع پرورشی ماهیان آب شیرین و شور است که بر خلاف IHN به صورت شاخص در ماهیان قزل‌آلای با اندازه بزرگ بروز می‌کند. یکی از شیوه‌های جدید معرفی شده در پایش این ویروس در محیط های طبیعی و آزمایشگاهی استفاده از تکنیک جدیدی از PCR به نام assay (qRT-PCR) می باشد که این آزمون در ردیابی سریع ماهیان قبل از تأیید از طریق کشت سلولی و بالاخص در ردیابی عفونت در ماهیانی که علائم کلینیکی بیماری را نشان نمی دهند کارایی بالایی دارد (۵).

نکروز عفونی لوزالمعده (IPN) باعامل ویروسی متعلق به جنس *Aquabirnavirus* یک بیماری مسری حاد است که بطور کلاسیک

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۰۰۴۰، نمابر: ۰۳۸۱-۳۳۶۱۰۴۵ Email: fadaeifard@gmail.com

موجب بروز بیماری در اکثر آزاد ماهیان پرورشی آبهای شیرین می‌گردد و گاهی تا ۱۰۰ ٪ تلفات در ماهیان ۱-۴ ماهه را به دنبال دارد. در حال حاضر پذیرفته شده که بیرناویروس‌ها دارای انتشار وسیعی در ماهیان، نرم تنان و سخت پوستان آبهای شیرین و دریایی هستند. اگرچه ۱۰ سروتیپ در ویروس IPN شناخته شده است ولی اکثر موارد بروز بیماری مربوط به سه سروتیپ آن یعنی Sp، Ab (سروتیپ کلاسیک اروپایی) و VR-299 (سروتیپ کلاسیک آمریکایی) است (۱۴). در سال‌های گذشته وقوع بیماری IPN در ایران و ردیابی آن در تخم و بچه ماهیان قزل‌آلا گزارش شده و بعنوان یکی از عوامل مهم در مرگ و میر بچه ماهیان در مراکز تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا شناخته می شوند (۱،۱۱).

Williams و همکاران در سال ۱۹۹۹ با انجام تست PCR Multiplex Reverse Transcriptase موفق به شناسایی همزمان سه ویروس IPN، IHN و VHS شدند. میزان حساسیت این تست برای سه ویروس یاد شده به ترتیب برابر با ۱،۱۰۰ و ۳۲/۵ ٪ دوز عفونی کشت بافتی در هر میلی لیتر بود (۱۶). با توجه به وجود برخی تلفات مشکوک به بیماریهای ویروسی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و شناسایی این گونه عوامل توسط برخی محققین در کشور، تحقیق حاضر به دنبال بررسی میزان آلودگی تخم‌های چشم زده (یا بعضاً سبز) داخلی و خارجی به سه ویروس بیماریزای IHN، IPN و VHS است تا بتوان بدین طریق اطلاعات منطقه‌ای از وضعیت نسبی حضور این ویروس‌ها در تخم های تکثیر شده در منطقه چهارمحال و بختیاری بدست آورد.

مواد و روش کار

۱- منطقه جغرافیایی: به منظور ردیابی سه ویروس IHN، IPN و VHS در تخم‌های چشم زده استحصال شده از مولدین داخلی و تخم‌های خریداری شده خارجی طی مدت ۴ ماه (زمستان ۸۹ الی بهار ۹۰) اقدام به نمونه‌برداری از برخی مزارع تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان چهارمحال و بختیاری شد. بدین منظور سه شهرستان پر تولید (فارسان، کوهرنگ و لردگان) انتخاب گردیده و در هر شهرستان نیز سه مزرعه انتخاب و از هر مزرعه ۲۰ عدد تخم به طور تصادفی از انکوباتورها برداشت و در شرایط استریل وارد لوله آزمایش و سپس تانک ارت مایع نموده و به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. در ضمن در هر مزرعه سعی می‌شد از تخم‌های ایرانی و خارجی به نسبت مساوی نمونه‌گیری شود تا در یک حجم نمونه یکسان مورد ارزیابی قرار گیرند همزمان نیز اطلاعات لازم از قبیل میزان تولید بچه ماهی در سال و برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اخذ می‌گردید.

۲- عملیات آزمایشگاهی و انتخاب پرایمرها: تخم‌ها بعد از ورود به آزمایشگاه ابتدا در فریزر $-70^{o}C$ نگهداری شده تا اقدامات بعدی بر روی آنها انجام گردد. سپس نمونه‌ها با استفاده از آزمون ترانس کریپتاز معکوس چندگانه (Multiplex Reverse Transcriptase PCR) به منظور ردیابی هر سه ویروس در آنها بر اساس پروتکل اعلام شده توسط Williams و همکاران در سال ۱۹۹۹ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶). لذا از پرایمرهای مربوط به هر ویروس با توالی، اندازه باند و ژن هدف مشخص استفاده گردید (جدول۱).

۳- فرآیند تشخیص مولکولی وواکنش زنجیره‌ای پلیمراز: با توجه به اینکه سه ویروس مختلف بایستی ردیابی می‌شد لذا بدین منظور ابتدا نمونه‌های تخم هر مزرعه و هر شهرستان به تفکیک مشخص واقدام به آماده‌سازی تیوبهای مخصوص نمونه گردید بطوریکه هر ۵ عدد تخم (از هر ۲۰ تخم هر چری) را به طور تصادفی و از انکوباتورهای مختلف وارد یک لوله کرده و آن را کاملاً به هم زده تا یک مخلوط یکنواخت حاصل گردید. جهت استخراج RNA از نمونه‌های مورد مطالعه از کیت Tripure ساخت شرکت Roche applied science طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد. جهت ساخت cDNA از نمونه های RNA استخراج شده در مرحله اول ۵µL، DEPC-Water به همراه ۱µL Random Hexamer و ۲µL از RNA مربوط به هر نمونه در یک لوله استریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای $65^{o}C$ انکوبه گردید. پس از ۵ دقیقه سرد کردن لوله روی یخ به مخلوط فوق ۵µL RT buffer 5X، ۲µL, M-Mulv، dNTP 10 mM و ۱µL، آنزیم M-Mulv RT اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای $37^{o}C$ قرار داده شد. جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از دستگاه Cycler gradient (Eppendorf) Master با حجم ۵۰µL واجد ۵µL PCR buffer 10X، ۱mmol، MgCl2، ۱۵۰µmol، dNTP، ۱۰۰pmol از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵µL از cDNA مربوط به هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل 94^{o} ۴ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری 94^{o}، ۳۰ ثانیه، 60^{o}، ۳۰ ثانیه، 72^{o}، ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی 72^{o}، ۱۰ دقیقه. جهت تائید وجود قطعات تکثیر یافته، ۲۰µL از محصول PCR روی ژل ۱ ٪ آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز گردید.

نتایج

پس از انجام عملیات نمونه برداری و ردیابی مولکولی میزان فراوانی ویروس‌های مورد تحقیق درهر شهرستان و همچنین بسته به نوع تخم (خارجی یا ایرانی) مورد ارزیابی قرار گرفت. به ترتیب نتایج مقایسه درصد آلودگی در مناطق مختلف استان در جدول ۲ و میزان آلودگی درانواع مختلف تخم در جدول ۳ آورده شده است. انجام تست PCR-MultiplexRT نیز در تصویر ۱ مشخص گردیده است. بیشترین آلودگی ویروسی در بین مناطق مختلف در منطقه فارسان با ۱۹/۱۵ ٪ و کمترین آن در مناطق لردگان و کوهرنگ به ترتیب ۳/۳۳ و ۰/۸۳ ٪ مشاهده گردید. در مقایسه بین انواع ویروس‌ها نیز IPN، IHN و VHS به ترتیب دارای ۱۰،۱۲/۵

جدول ۱ـ توالی، اندازه باند و ژن هدف پرایمرهای مورد استفاده برگرفته از تحقیق Williams و همکاران در سال ۱۹۹۹.

ویروس	توالی پرایمر	اندازه باند (جفت باز)	ژن هدف
IPN	WB1(CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC) WB2(CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG)	۲۰۶	VP2
IHN	IHN3 (GTTCAACTTCAACGCCAACAGG) IHN4 (TGAAGTACCCCACCCCGAGCATCC)	۳۷۱	N
VHS	VHS3 (CGGCCAGCTCAACTCAGGTGTCC) VHS4 (CCAGGTCGGTCCTGATCCATTCTGTC)	۶۲۵	G

جدول۲ ـ میزان آلودگی تخم چشم زده (داخلی وخارجی) به ویروس های IHN، VHS و IPN در استان چهارمحال و بختیاری (از ۱۸۰ نمونه کل).

منطقه	لردگان				کوهرنگ				فارسان				کل (نمونه های مثبت)	
	منفی		مثبت		منفی		مثبت		منفی		مثبت			
نوع ویروس	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
VHS	۱۲/۵	۱۵	۰	۰	۸/۳۳	۱۰	۰	۰	۱۱/۶۶	۱۴	۰/۸۳	۱	۰/۸۳	۱
IHN	۱۱/۶۶	۱۴	۰/۸۳	۱	۸/۳۳	۱۰	۰	۰	۳/۳۳	۴	۹/۱۶	۱۱	۱۰	۱۲
IPN	۱۰	۱۲	۲/۵	۳	۷/۵	۹	۰/۸۳	۱	۳/۳۳	۴	۹/۱۶	۱۱	۱۲/۵	۱۵
جمع	۳۴/۱۶	۴۱	۳/۳۳	۴	۲۴/۱۶	۲۹	۰/۸۳	۱	۱۸/۳۲	۲۲	۱۹/۱۵	۲۳	۲۳/۳۳	۲۸

جدول ۳ ـ میزان آلودگی تخم (از ۱۸۰ نمونه کل) به انواع ویروس ها بر حسب منبع تخم خریداری شده (ایرانی یا خارجی).

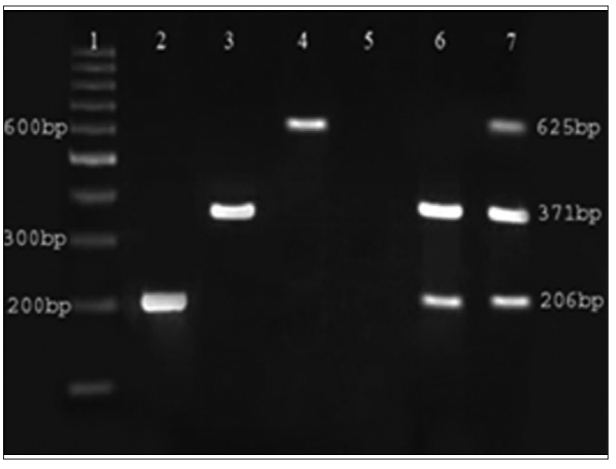
منبع تخم	خارجی				ایرانی				کل (نمونه‌های مثبت)	
	منفی		مثبت		منفی		مثبت			
ویروس	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
VHS	۱۷/۵	۲۱	۰/۸۳	۱	۱۵	۱۸	۰	۰	۰/۸۳	۱
IHN	۱۴/۱۶	۱۷	۰/۸۳	۱	۸/۳۳	۱۰	۹/۱۶	۱۱	۱۰	۱۲
IPN	۱۵	۱۸	۱/۷۶	۲	۶/۶۶	۸	۱۰/۸۳	۱۳	۱۲/۵	۱۵
جمع	۴۶/۶۶	۵۶	۳/۳۲	۴	۳۰	۳۶	۲۰	۲۴	۲۳/۳۳	۲۸

و۰/۸۳٪ آلودگی بوده‌اند. در مقایسه بین پراکنش ویروس ها میان تخم‌های داخلی و خارجی نیز آلودگی تخم‌های ایرانی نسبت به تخم‌های خارجی بالاتر بود (جدول ۳). بطوریکه تخم های چشم زده ایرانی با ۲۰٪ و خارجی با ۳/۳۳٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی را داشته‌اند. البته در بین تخم‌های ایرانی نیز IPN بالاترین میزان درگیری را داشت. در ضمن دمای آب مزارع مختلف به ترتیب در مناطق فارسان، کوهرنگ و لردگان ۱۱، ۸ و۱۱ ^{o}C بود.

بحث

در سال های اخیر استفاده از تخم چشم زده در مزارع تکثیر روند رو به رشدی داشته بطوریکه بسیاری از مزارع پرورشی اقدام به خرید تخم از مراکز داخل و خارج از کشور نموده و در امر تولید بچه ماهی مبادرت می‌ورزند باتوجه به بروز برخی تلفات وعلائم مشکوک به این بیماریها در مراکز تکثیر استان چهرمحال و بختیاری مقرر گردید مطالعه‌ای با هدف ردیابی مولکولی ویروس های فوق در مزارع تکثیر بچه ماهی سه شهرستان فارسان، لردگان و کوهرنگ که در زمینه خرید تخم چشم زده داخلی و خارجی از نقاط مختلف فعالیت دارند صورت پذیرد تا بتوان اطلاعات نسبی از وضعیت حضور عوامل ویروسی ذکر شده بدست آورد.

بیشترین میزان درگیری ویروسی درمطالعه حاضر در شهرستان فارسان (با سطح آلودگی ۱۹/۱۵ ٪) به چشم می خورد گرچه با توجه به تعداد نمونه‌ها و محاسبات آماری بدست آمده نمی توان نتیجه بدست آمده را در کل شهرستان تعمیم داد ولی از آنجائیکه میزان تولید بچه ماهی و خرید تخم چشم زده در این شهرستان از سطح بالایی برخوردار بوده و بیشترین فعالیت آبزی پروران این منطقه در زمینه تکثیر بچه ماهی است لذا ارتباط بین بالا بودن میزان آلودگی ویروسی از یک طرف و مشاهده تلفات و بیماریهای نزدیک به ویروس های مورد مطالعه از طرف دیگر چندان دور از انتظار نیست یکی دیگر از نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز بالا بودن آلودگی IPN و IHN نسبت به ویروس VHS بوده است که به احتمال به میزان آلودگی مولدینی که از آنها تخم‌گیری شده و شرایط بهداشتی مزرعه‌ای بر می‌گردد. در ارتباط با ردیابی و مطالعه دو ویروس IPN و IHN نیز گزارشات متعددی توسط محققین مختلف کشورمان



تصویر۱ـ شناسایی همزمان ویروس‌های IHN، VHS و IPN در ژل آگارز با تکنیک RT-PCR، لاین۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، لاین۲: باند ۲۰۶ جفت باز ویروس IPN، لاین۳: باند۳۷۱ جفت باز ویروس IHN، لاین ۴: باند۶۲۵ جفت باز ویروس VHS، لاین ۵:کنترل منفی، لاین های ۶ و ۷ حضور همزمان سه ویروس در ژل.

صورت گرفته است بطوریکه Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۰ (الف) با استفاده از تکنیک (RT-PCR)وبررسی بیش از۱۵۰لاروماشکوک به بیماری IHN با وزن کمتر از ۳g در مزارع پرورش قزل‌آلای استان چهارمحال و بختیاری متوجه آلودگی در ۳۳/۳ ٪ کل جمعیت مورد مطالعه شدند که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۱۰). همچنین Khiabanian Asl و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز با استفاده از تست ایمونوهیستوشیمی و PCR ردیابی ویروس IHN را در برخی مزارع تکثیر بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ایران گزارش نمودند(۶). Fallahi و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز با استفاده از تست آنتی بادی درخشان به روش غیر مسقیم (antibody test indirect florescent) توانستند از بین ۹۹ نمونه ماهی، ۱۱ نمونه مثبت آلوده به ویروس IHN از استان چهارمحال و بختیاری گزارش کنند(۲). همچنین Zargar و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بهره گیری از دو تست آنتی بادی درخشان به روش غیر مسقیم و RT-PCRتوانستند از ۳۰ مزرعه مورد مطالعه در این استان ۲۷ نمونه مثبت آلوده به IHN اعلام نمایند(۱۷). در ارتباط با تحقیقات انجام شده در خصوص IPN نیز می توان به کار Hosseini and Akhlaghi در سال ۲۰۰۷ اشاره داشت ایشان اولین گزارش ردیابی ویروس IPN را از بچه ماهیان ایران اعلام نمودند(۱). Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۰ (ب) نیز ماهیان مشکوک ۳۸ کارگاه تکثیر و پرورش در استانهای چهارمحال وبختیاری و کهگیلویه و بویر احمد را مورد بررسی قرارداده و ۱۲ مزرعه را آلوده به ویروس IPN اعلام نمودند. میزان آلودگی در چهارمحال ۳۳/۳ ٪ و در کهکیلویه ۲۸/۵ ٪ بود (۱۱). در ارتباط با ویروس VHS مطالعه چندانی در کشورمان انجام نگرفته و نتایج حاصل از تحقیق حاضر را می توان به عنوان یکی از مطالعات مستند مرتبط با این بیماری دانست گرچه که میزان فراوانی این ویروس نسبت به دو ویروس دیگر کمتر بوده است اما آگاهی از وجود ویروس و ادامه تحقیقات به منظور کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

رعایت اصول بهداشتی، تنوع تخم وارد شده به هچریها از منابع مختلف (داخل و خارج از کشور)، نحوه حمل تخم و توزیع آن در انکوباتورها، اصول حمل بچه ماهی و استفاده از غذای با کیفیت مختلف در کاهش یا افزایش این سطح درگیری بسیار اثر گذار است. مقایسه میزان آلودگی در تخم های مختلف بر حسب منبع تولید (داخلی یا خارجی) نشان از آلودگی بالای تخم های تولید شده در مراکز تکثیر داخل کشور دارد (۳). بطوریکه تخم های ایرانی با ۲۰٪ بالاترین و تخم های خارجی با ۳/۳۳٪ پائین ترین میزان آلودگی را داشته‌اند به ترتیب بر حسب نوع ویروس بیشترین سطح آلودگی را در تخم‌های داخلی و خارجی ویروس‌های IPN، IHN و VHS داشته‌اند که با توجه به جدول ۲ فراوانی ویروس IPN و IHN را در مراکز تکثیر استان و وضعیت اپیدمیولوژیک این دو ویروس را نشان می دهد. یکی از نتایج این تحقیق نیز ردیابی ویروس VHS می باشد هر چند که میزان آلودگی آن در بین مزارع پائین بوده و کمترین سطح آلودگی را به خود اختصاص داده است ولی اهمیت آن از نقطه نظر اپیدمیولوژیکی بالا بوده و بایستی توجه لازم را به آن مبذول داشت. اعتقاد بر این است که انتقال رابدویروس‌های IHN و VHS بین گونه‌های مختلف آزاد ماهیان از طریق آب صورت گرفته و منجر به بروز همه‌گیری و تلفات در بین آنها می‌گردد (۱۵).

ویروس‌های بیماریزای IHN، IPNو VHS عموماً در دوره نوزادی و انگشت قدی خسارات و تلفات عمده‌ای را به همراه دارند و در این میان تخم به عنوان یکی از مهمترین منابع انتقال عفونت به شمار می رود لذا با توجه به روند رو به رشد تولید تخم چشم زده در کشور و همچنین ورود فزاینده تخم از کشورهای دیگر لزوم توجه بیش از پیش به فرآیند تکثیر در مزارع ضروری است لذا بایستی به موارد مهمی از قبیل نحوه استحصال تخم، کنترل بیماریهای عفونی بالاخص ویروسی در بین مولدین، انجام تست‌های غربالگری در بین آنها، استفاده از ترکیبات ایمنی‌زا و توجه به پروتکل امنیت موجود زنده (Biosecurity) توجه نمود. در راستای شناسایی و ردیابی عوامل ویروسی و باکتریایی در بین ماهیان امروزه استفاده از تست‌های کم هزینه، سریع و مطمئن از جمله تست‌های مولکولی همچون PFLP، PCR و RT-PCR مرسوم شده است. این قبیل تست‌ها در تشخیص دقیق عوامل ویروسی و توسط افراد مختلف کاربرد داشته است بطوریکه ردیابی همزمان چند ویروس با تکنیک RT-PCR Multiplex نیز کمک شایانی در تشخیص سریع و دقیق بیماریهای ماهی نموده است (۱۶). همانند تحقیق حاضر نیز در کشور آلمان از آزمون PCR-RT در ردیابی و تفریق ویروس VHS و IHN در نمونه‌های اندامی و سلول های کشت داده شده صرف نظر از نوع سروتیپ در ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان استفاده شد لذا با آزمایش مستقیم بافت از طریق تست PCR امکان ردیابی RNA ویروسی در ماهیان بیمار حاد و تحت حاد تا مزمن همانند ماهیان بدون علامت حامل دو ویروس VHS و IHN فراهم گردید

(۹). سرولوژی نیز از راههای پیشنهادی شناسایی ویروس IHN در ماهیان آزاد اقیانوس اطلس بوده است (۱۳). از تست‌های مولکولی جدیدتر بکار رفته در تشخیص ویروس‌های بیماریزای ماهی نیز می توان به کاربرد RT-PCR(۷)، استفاده از پروتکل (RT-LAMP) amplification Reverse Transcription Loop-mediated isothermal (۴)، استفاده از فناوری padlock probe (MPP) employing moleculr اشاره نمود (۸).

در تحقیق حاضر که با هدف بررسی میزان آلودگی تخم‌های چشم‌زده داخلی و خارجی قزل‌آلای رنگین‌کمان به ویروس‌های IHN، IPN و VHS در محدوده استان چهارمحال و بختیاری انجام پذیرفت همانطور که در نتایج پیداست فراوانی حضور ویروس در شهرستان فارسان از بقیه بیشتر بوده است که البته با مشاهدات به عمل آمده از تلفات بچه ماهیان و علائم همراه آن در این منطقه و بالا بودن آمار درگیری ویروسی در تحقیق حاضر می‌توان این ارتباط را بین آنها برقرار نمود ولی این خود مستلزم انجام تحقیقی دیگر با موضوعیت بررسی وضعیت ویروس‌های فوق در بچه ماهیان این مراکز می‌باشد تا بطور کاملاً منطقی وضعیت حضور ویروس‌های فوق را در بین بچه ماهیان نیز مشخص نمود. همچنین در مقایسه میزان آلودگی بین تخم‌های ایرانی و خارجی درصد آلودگی در تخم‌های ایرانی چندین برابر تخم‌های خارجی بوده است البته شواهد نشان از حضور هر سه ویروس بالاخص IHN و IPN در هر دو نوع تخم دارد که ضرورت بازنگری در برنامه های تولیدی مزارع تکثیر کشور را می‌طلبد. یکی از سیاست‌های مهم در برخورد با عوامل عفونی در آبزیان اجرای پروتکل امنیت موجود زنده (Biosecurity) است بطوری که استفاده از قرنطینه، رعایت اصول بهداشتی و ضدعفونی ماهیان و تجهیزات امری لازم الاجرا است. همچنین یکی از جدیدترین شیوه‌های برخورد با عوامل ویروسی بکارگیری یک عامل ویروسی برای مقابله با عامل ویروسی دیگر است بطوریکه در سال‌های اخیر در پیشگیری از بیماری IHN ماهیان را در معرض ویروس IPN قرار داده و ایمنی ضد ویروس IHN را در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مشاهده کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر از بودجه طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تأمین شده و لذا از معاون محترم پژوهش و فناوری و پرسنل محترم آن مجموعه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. Akhlaghi, M., Hosseini, A. (2007) First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 27: 79-84.
2. Fallahi, R., Soltani, M., Zorriezahra, M.E.J., Hemmatzadeh, F. (2006) Serological diagnosis of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in rainbow trout using indirect florescent antibody test. J. Vet. Res. 61: 19-22.
3. FAO (2008) State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.
4. Gunimaladevi, I., Kono, T., LaPatra, S.E., Sakai, M. (2005) A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Virol. 150: 899-909.
5. Hope, K.M., Casey, R.N., Groocock, G.H., Getchell, R.G., Bowser, P.R., Casey, J.W. (2010) Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. J. Aquat. Anim. Health. 22: 50-61.
6. KhiabanianAsl, A.H., Soltani, M., Kazemi, B., Haghdoust, I.S., Sharifpour, I. (2007) Use of immunohistochemical and PCR methods in diagnosis of infection haematopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheries in Iran. Pak. J. Biol. Sci. 10: 230-234.
7. Knüsel, R., Bergmann, S.M., Einer-Jensen, K., Casey, J., Segner, H., Wahli, T. (2007) Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? J. Fish. Dis. 30: 559-568.
8. Millard, P.J., Bickerstaff, L.E., LaPatra, S.E., Kim, C.H. (2006) Detection of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus by molecular padlock amplification, J. Fish. Dis. 29: 201-213.
9. Miller, T.A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R.W., Enzmann, P.J. (1998) Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish

pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org. 34: 13-20.

10. Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M., Moumeni, M. (2010a) Use of RT-PCR in diagnosis of infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout hatcheries, Iran. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 1510-1514.
11. Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M., Momeni, M., Hosseinifard, M. (2010b) Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in two major rainbow trout fry producing provinces of Iran with respect to clinically infected farms. J. Food. Agric Environ. 8: 614-615.
12. Soltani, M. (2002) Salmonid diseases. (1st ed.) University of Tehran press. Tehran, Iran.
13. St-Hilaire, S., Ribble, C.S., LaPatra, S.E., Chartrand, S., Kent, M.L. (2001) Infectious hematopoietic necrosis virus antibody profiles in naturally and experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*, Dis Aquat Org. 46:7-14.
14. Sweeney, A., Blake, S., Singer, J.T., Nicholson, B.L. (1997) Detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by polymerase chain reaction (PCR). In: New approaches to viral disease of aquatic animals. Inui, Y., Winton, J. (eds.), National Research Institute of Aquaculture. Nansei, Japan. p. 42-47.
15. Wang,W., Lee, J., Shieh, M., Wi, Y., Huang, C., Chien, M. (1996) Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from an outbreak in Taiwan by serological and polymerase chain reaction assays. Dis Aquat Org. 26: 237-239.
16. Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J.T., Nicholson, B.L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses.J Clin Microbiol. 37: 4139-4141.
17. Zargar, A., Soltani, M., Hematzadeh, F., Kazemi, B., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2008) Study on distribution of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in five major provinces producing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Iran by indirect fluorescence antibody (IFAT) and nested-RT-PCR techniques. J. Vet. Res. 63: 99-105.

J.Vet.Res. 67,4:393-399,2012

Evaluation of infectious hematopoietic necrosis, infectious pancreatic necrosis and viral hemorrhagic septicemia viruses in Iranian and imported rainbow trout eggs: A cross sectional study

Fadaeifard, F.[1*], Raissy, M.[1], Moumeni, M.[2], Faghani, M.[3]

[1]*Departement of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine , Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.*

[2]*Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.*

[3]*Departement of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.*

(Received 16 June 2012 , Accepted 3 September 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Infectious hematopoietic necrosis (IHN), viral hemorrhagic septicemia (VHS) and infectious pancreatic necrosis (IPN) as important viral diseases of salmonids, especially rainbow trout can be led to mass mortality among cultured fish. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to show if IHN, IPN and VHS viruses can be detected in Iranian and imported rainbow trout eyed eggs and to compare their abundances among the hatcheries of 3 regions (Farsan, Koohrang and Lordegan) in Chaharmahal va Bakhtyari Province. **METHODS:** In each area, three hatcheries were selected, 20 eyed eggs were randomly sampled from each farm. The samples were transferred into the sterile tubes and identified by reverse transcriptase -PCR. Meanwhile, physicochemical factors were recorded for each fish. **RESULTS:** While total infection rate in eggs was 23.3 %, the level of infection for IPN, IHN and VHS was 12.5%, 10% and 0.83%, respectively. In this respect, maximum and minimum frequency were observed in Farsan (19.15%) and Koohrang (0.83%). Comparison of the infected of eggs, based on their origin, showed that the infection rates in Iranian and imported eggs were 20% and 3.33%, respectively. **CONCLUSIONS:** The results revealed that rainbow trout eggs should be considered as major source for transmission of aquatic viruses. Hence, molecular identification of above mentioned viruses in rainbow trout eggs should be done.

Key words: viral hemorrhagic septicemia (VHS), infectious pancreatic necrosis (IPN), Infectious hematopoietic necrosis (IHN), eggs, Iran.

Figure Legends and Tabel Captions

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon sizes.

Table 2. Infection of eyed eggs to IHNV, NHSV, IPNV in Chaharmahal va Bakhtiary province.

Table 3. Infection of eyed eggs to all viruses based on source of eggs.

Figure 1. Amplification products from infected rainbow trout using multiplex PCR assay for detection of IPNV (206 bp), IHNV (371bp) and VHSV (526bp). Lane 1, 100 bp DNA ladder; lanes 2, 3, 4 are IPNV, IHNV and VHSV positives, respectively. lane 5, negative control; lanes 6 and 7 are the simultaneous detection of viruses in samples.

***Corresponding author's email: fadaeifard@gmail.com, Tel: 0381-3340040, Fax: 0381-3361045**