وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

مطالعه بیماری نکروز عصبی ویروسی (جداسازی ، شناسائی و بیماریزائی آن) درکفال ماهیان دریای خزر و احتمال انتقال آن به سایرماهیان

مجری مسئول :
سید جلیل ذریه ز هرا

شماره ثبت
٤٣٠١٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان پروژه ملی : مطالعه بیماری نکروز عصبی ویروسی(جداسازی ، شناسائی و بیماریزائی آن) درکفال ماهیان دریای خزر و احتمال انتقال آن به سایرماهیان

شماره مصوب پروژه : ۸۵۰۱۵-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۱۰۰-۰

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سید جلیل ذریه ز هرا

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : سید جلیل ذریه ز هرا

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محدث قاسمی پژوهشکده آبزی پروری (آبهای داخلی) گیلان(انزلی)، مریم قیاسی (پژوهشکده اکولوژی دریای خزر) ، سمیه حقیقی (انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان)

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عیسی شریف پور – سیدعلی قرشی – اسماعیل صابرفر- مصطفی شریف روحانی – جمال نجفی – پروانه صیفوری- شهریار بهروزی – فرامرز لالویی – علیرضا شناورماسوله – جلیل معصوم زاده – محمد مهدیزاده- محمدرضا میرهاشمی نسب- کامران اصغرنیا- ریحانه صالحی تبار- شاپورکاکولکی- سهیل بازاری مقدم- علی حلاجیان- مهدی علیزاده-جلیل جلیل پور- فریدون چکمه دوز-حسن نظام آبادی- منیره فقید- علی اصغر سعیدی- محمد بینایی- محبوبه نیرانی – آذین زاهدی-علیرضا نظری – بهراز مخبر ملکی – بابک رمضانی –رضا نهرور- جواد دقیق روحی – عباس نوری – غلامرضا درویشی – عباس بری – فیروزه فرح تاج-مهدی سلطانی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان تهران

تاریخ شروع : ۸۵/۱/۱

مدت اجرا : ۴ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۲

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه ملی : مطالعه بیماری نکروز عصبی ویروسی(جداسازی ، شناسائی و بیماریزائی آن) درکفال ماهیان دریای خزر و احتمال انتقال آن به سایرماهیان

کد مصوب : ۸۵۰۱۵-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۱۰۰-۰

شماره ثبت (فروست) : ۴۳۰۱۰ تاریخ : ۹۲/۳/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سید جلیل ذریه ز هرا دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۸۹/۸/۲۹ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس مرکز در تحقیقات ماهیان سردآبی کشور (تنکابن) مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
مقدمه ۳
۱- کلیات ۵
۱-۱- ماهیان استخوانی ۵
۱-۲- معرفی بیماری ۱۳
۱-۳- اپیدمیولوژی بیماری ۱۶
۱-۴- تشخیص بیماری ۲۱
۱-۵- روشهای آزمایشگاهی شناسایی ویروس ۲۴
۱-۶-پیشینه تحقیق و تاریخچه بروز بیماری و مروری بر کارهای گذشته در ایران ۳۱
۲- مواد و روش کار ۳۷
۲-۱- مواد مصرفی ۳۷
۲-۲- لوازم غیر مصرفی ۳۸
۲-۳- روش کار ۳۹
۲-۳-۱- صید و انتقال ماهیان ۴۰
۲-۳-۲- زیست سنجی و نمونه برداری ۴۲
۲-۳-۳- آزمایش آسیب شناسی بافتی ۴۳
۲-۳-۴- آزمایش هماتولوژی وسرمی ۴۴
۲-۳-۵-آزمایش ایمونوهیستوشیمی ۴۶
۲-۳-۶- کشت سلول ۴۷
۲-۳-۷-آزمایش پادتن های درخشان به روش غیر مستقیم ۴۸
۲-۳-۸- آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز ۴۹
۲-۳-۹- میکروسکوپ الکترونی ۵۳
۲-۳-۱۰- تهیه نمونه وانجام آزمایشات باکتری شناسی ۵۳
۲-۳-۱۱- تهیه نمونه وآزمایش سنجش فلزات سنگین ۵۴
۲-۳-۱۲- مواجهه سازی (Challenge) ۵۴

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳- نتایج ۶۰
۱-۳- زیست سنجی و مشاهدات بالینی ۶۰
۲-۳- پارامترهای هماتولوژی و سرمی ۶۳
۳-۳- یافته های باکتری شناسی ۷۲
۴-۳-یافته های آزمایشات فلزات سنگین ۷۴
۵-۳-آسیب شناسی بافتی ۷۵
۶-۳- ایمونوهیستوشیمی ۷۸
۷-۳- کشت سلول ۷۹
۸-۳- پادتن های درخشان به روش غیر مستقیم ۸۱
۹-۳- واکنش زنجیره ای پلی مراز ۸۵
۱۰-۳- میکروسکوپ الکترونی ۹۲
۱۱-۳- مواجهه سازی (Challenge) ۹۳
۴- بحث و نتیجه گیری ۱۰۵
پیشنهادها ۱۲۳
منابع ۱۲۶
پیوست ۱۳۵
چکیده انگلیسی ۱۷۷

چکیده

این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی نوداویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی(VNN) از ماهیان کفال طلایی*(liza auratus)* دریای خزر صید شده در صیدگاههای استانهای حاشیه جنوب دریای خزر شامل گیلان، مازندران و گلستان و با کمک روشهای کشت سلولی، واکنش زنجیره ای پلیمراز دو مرحله ای -Nested) (RT-PCR ، آزمایش پادتن های درخشان(IFAT) ، ایمونوهیستوشیمی (IHC) ، هیستوپاتولوژی، هماتولوژی، باکتریولوژی و میکروسکوپ الکترونی انجام شد.

پس از دریافت گزارشهای متعدد مبنی بر بروز تلفات و مشاهده علایم بالینی شامل شنای نامتعارف (مارپیچی، چرخشی، خوابیده به پشت در سطح آب) و اتساع محوطه شکمی در ماهیان کفال طلایی صید شده در صیدگاههای سه استان مذکور ضمن مراجعات مکرر به پره های صیادی در طول فصول صید سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ تعداد ۴۲۸ ماهی کفال طلایی در محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم نمونه برداری گردیدندکه تعدادی در حدود ۳۱۲ ماهی کفال در استان گیلان و ۱۱۶ عدد نیز از استانهای گلستان و مازندران صید شدند که اغلب آنها دارای علائم بالینی همچون شنای نامتعادل، تیرگی رنگ بدن و اتساع محوطه شکمی بودند.

بافتهای مغز و چشم از ماهیان مورد مطالعه در شرایط استریل جداسازی و جهت انجام آزمایشات کشت سلولی و Nested-RT-PCR در فریزر ^{oc} ۸۰ – نگهداری شدند. به طور همزمان قطعاتی از بافتهای مذکور در فرمالین ۱۰ درصد جهت انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی و قطعه ای در گلوتارآلدهید ۳ درصد برای آزمایش میکروسکوپ الکترونی تثبیت گردیدند.شش روز بعد از تلقیح هموژن فیلتر شده بافتهای مغز و چشم بر روی تک لایه سلولی SSN-1 ، آثار آسیب سلولی (CPE) به صورت واکوئولاسیون مشاهده شد که در پاساژهای دوم و سوم نیز با شدت بیشتری ایجاد گردید. در مجموع تلقیح هموژن ۹ نمونه از ۳۱۲ ماهی باعث ایجاد CPE گردید.

انجام آزمایش Nested- RT-PCR بر روی نمونه های بافتی و سلول های SSN-1 آلوده شده(CPE مثبت) نتایج مشابهی را به همراه داشت. در آزمایش مستقیم نمونه های بافتی تعداد ۲۱ نمونه مثبت بود وهمچنین تمام نمونه های حاصل از سلولهای SSN-1 آلوده(CPE مثبت) در آزمایش مزبور مثبت تشخیص داده شدند.

در ادامه تشخیص نوع ویروس، آزمایش پادتن های درخشان با استفاده از دو نوع آنتی بادی مونوکلونال مختلف برروی مقاطع بافتی مغز و چشم ماهیان کفال دارای علایم و سلول های آلوده شده SSN-1 انجام شدکه ایجاد نقاط درخشان حاکی از وجود آنتی ژن نودا ویروس در نمونه های مورد آزمایش بود و نتایج کشت سلول و Nested- RT- PCR را تایید نمود.

در آزمایشات آسیب شناسی بافتی، واکوئولاسیون در مقاطع مغز و شبکیه چشم، نخاع و عصب بینایی در اکثر نمونه ها مشاهده گردید و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد نودا ویروس و رنگ آمیزی DAB بر روی

مقاطع بافتی در آزمایش ایمونوهیستوشیمی، حضور آنتی ژن های نودا ویروس به صورت نقاط قرمز- قهوه ای مشخص گردید.

در آزمایش میکروسکوپ الکترونی با توجه به پراکندگی ویروس در نمونه های بافتی، مقاطع ویروس به صورت دوایری با قطر حدود ۳۰ nm و دارای آرایش منظم تنها در یک نمونه از مقطع چشم ماهی کفال طلائی مشاهده گردید.

به منظور تعیین بیماریزایی ویروس جداشده و بررسی امکان انتقال آن از ماهی کفال طلائی به گونه های دیگر، سوپرناتانت سلول SSN-1 دارای CPE با ماهیان گوپی (به صورت حمام) و بچه ماهیان قره برون (به صورت تزریق در پشت حدقه چشم) مواجهه داده شد که در هر دو مورد علاوه بر بروز علایم بالینی، واکوئولاسیون شدید در مغز و شبکیه چشم آنها نیزمشاهده شد.

در ادامه مطالعات بیماریزائی، نمونه های ماهی گوپی دارای علائم بالینی با میکروسکوپ الکترونی و آزمایش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصله نشان داد که حضور نودا ویروس با بروز علایم بالینی، کالبد گشایی و تلفات در ارتباط بوده و می توان بتا نودا ویروس را به عنوان عامل اصلی تلفات ناشی از بروز بیماری نوپدید نکروز عصبی ویروسی (VNN) درکفال ماهیان دریای خزر محسوب نمود.

واژه کلیدی:

ایران ، دریای خزر، بیماری نکروز عصبی ویروسی، کفال طلایی، تیره سلولی SSN-1 ، آزمایش پادتن های درخشان، ایمونوهیستوشیمی، Nested-RT-PCR

مقدمه:

بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) یکی از مهمترین بیماری های ماهیان دریایی پرورشی و وحشی است که عمدتاً در بچه ماهیان و ماهیان جوان رخ داده و خسارات زیادی را در صنعت پرورش ماهیان دریایی ایجاد می کند. این بیماری از تمام نقاط جهان بجز قاره آفریقا گزارش شده و می تواند در مناطق دریایی گرمسیری ، معتدل و حتی مناطق سردسیرشیوع یابد. تا کنون ابتلای بیش از ۴۰ گونه از ماهیان دریایی پرورشی و وحشی به این بیماری گزارش شده است.

در پی وقوع تلفات گسترده درکفال ماهیان دریای خزر که در بهمن ماه سال ۱۳۸۲ در منطقه زیبا کنار استان گیلان رخ داد و نیز در بررسی ماهیان صید شده در گشت دریائی تیر ماه سال ۸۴ ، در بیش از ۹۳٪ از ماهیان کفال صید شده، علائم بالینی مشابه علائم بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) مشاهده گردید. علایم بالینی گزارش شده در ماهیان در حال تلف شدن شامل بی حالی، شنای نامتعادل، تیرگی رنگ بدن و بادکردگی محوطه شکمی بود. در بررسی کالبدگشایی، کیسه شنای اتساع یافته مشاهده می شد که احتمال حضور نوداویروس عامل بیماری(VNN) را در ماهیان مورد مطالعه مطرح نمود.

بررسی های اولیه بصورت Pilot study در همان سال انجام شد وآزمایشهای تشخیصی اولیه همچون آسیب شناسی و باکتریولوژی در کشور صورت گرفت و نمونه های مورد نظر به آزمایشگاه رفرانس OIE درکشور ژاپن و نیز دانشگاه ملی کشور تایوان ارسال گردید. نمونه های مغز ارسالی بر اساس روش RT- PCR و Nested PCR نسبت به Piscine nodavirus (عامل ایجاد بیماریVNN) مثبت بودند لیکن تلاش برای جداسازی ویروس احتمالی بر روی تیره های سلولی E-11 موفقیت آمیز نبود (ذریه زهرا، ۱۳۸۳). لذا با توجه به اهمیت موضوع و عنایت به دستورالعمل های تشخیصی سازمان (OIE) که تنها راه تائید تشخیص نهائی یک بیماری نوظهور ویروسی را مطالعات ویروس شناسی توصیه می نماید، تحقیق حاضر برای یافتن علت اصلی بروز این بیماری و جداسازی و شناسایی ویروس مورد نظر در کفال ماهیان و بررسی بیماریزائی آن بر روی گونه های حساس همچون ماهی گوپی(Guppy) و بچه ماهیان خاویاری (قره برون) صورت گرفت.

به دلیل مجاورت ماهیان خاویاری و ماهیان کفال در دریای خزر و نتایج بدست آمده در سوابق بیماری طی سالهای اخیربویژه مطالعه موردی انجام شده بر روی ۳۵ نمونه سوپرناتانت ارسالی از مغز و چشم ماهیان خاویاری وحشی در اسفند ماه ۱۳۸۳، احتمال انتقال بیماری بین این ماهیان نیز به عنوان یک فرضیه قوی در این تحقیق مطرح گردید. از طرفی بررسی احتمال حساسیت این گونه به بتا نودا ویروس، عامل اصلی ایجاد بیماری از اهداف اصلی این تحقیق بود، لذا بررسی حضور یا عدم حضور بتا نودا ویروس ها عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی در مولدین خاویاری وحشی ضروری بوده و مطالعه بر روی ماهیان خاویاری یکی از اهداف این تحقیق بود.

عفونت های نوداویروسی در بسیاری مقالات به عنوان بیماری ماهیان آبهای شورعنوان شده و درقاره آسیا نیز موجب تلفات در گونه های مختلف پرورشی دریایی مانند Seabass (Chew-Lim وهمکاران، ۱۹۹۸؛ Glazebrook و همکاران، ۱۹۹۰؛ Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Renault و همکاران، ۱۹۹۱؛ و Zafran و همکاران (۱۹۹۸) و گروپر(Boonyaratpalin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Chi و همکاران، ۱۹۹۷؛ Danayadol و همکاران، ۱۹۹۵؛ Zafran و همکاران، ۲۰۰۰) گردیده است ولی ابتلای کفال ماهیان دریای خزر به‌عنوان اولین مورد بروز این بیماری درماهیان لب شوردر جهان مطرح می باشد(ذریه زهرا و همکاران ۱۳۸۴) این مساله مهم می تواند نشانه تغییر گستره میزبانی ویروس از ماهیان آبهای شور به ماهیان آبهای لب شور یا حتی شیرین باشد.

با توجه به اینکه بیماری نکروز عصبی ویروسی اغلب ماهیان دریائی را مبتلا می نماید و با عنایت به خصوصیات اکولوژیک، شرایط جغرافیائی و هیدروبیولوژی دریای خزر بتوان تلفات اخیر کفال ماهیان را نخستین مورد وقوع بیماری مزبور در ماهیان آبهای لب شور(Brakish water) جهان دانست، ضمن آنکه مطالعات فیلوژنیکی و انجام آزمایش آنالیز سکانس بر روی ژنوتیپ ویروس عامل ایجاد بیماری از همان بدو تحقیقات، نشان از بروز نوعی موتاسیون در ژنوم و متعاقب آن ایجاد تفاوت های ساختاری و ژنتیکی جدید در ویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی در منطقه دریای خزر در مقایسه با سایر نمونه های مشابه در سایرکشور ها داشت بگونه ای که از سوی مشاورین علمی این پژوهش، نام GMNNV[1] به ویروس عامل این بیماری در کفال ماهیان دریای خزر نهاده شد.

از سوی دیگر از همان آغاز رخداد بیماری و شروع مطالعات Pilot study در سال ۱۳۸۲در منطقه زیباکنار گیلان، در انجام این تحقیق و روند پیشرفت آن، اساتید طراز اول بیماری نکروز عصبی ویروسی درجهان و مشاورین بین المللی همچون Prof.G.Bovo ازIstituto Zooprofilattico و مرکز رفرانس بیماری VNN ازکشور ایتالیا ، Prof.T.Nakaiاز دانشگاه هیروشیما و مرکز رفرانس بیماری VNN در کشور ژاپن، Prof. Chi Shau chi رئیس دپارتمان ویروس شناسی دانشگاه ملی کشور تایوان ، Prof. Igor shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (ARRIFF) از کشور روسیه و نیز Dr.Hassan Hj. Mohd Daud از دانشکده دامپزشکی دانشگاه UPM کشور مالزی به عنوان مشاورین علمی این تحقیق حضور موثر و مشارکت فعال داشته اند ضمن آنکه در انجام آزمایش های تکمیلی و تایید نتایج نیز مراکز رفرانس این بیماری از نظر سازمان بین المللی بیماری های واگیردام (OIE) در کشورهایی همچون ایتالیا و ژاپن همکاری و مشارکت داشته اند. در داخل کشور نیز در انجام مراحل گوناگون این تحقیق مجموعه ای متشکل از ۴۰ نفر از اساتید، محققین و کارشناسان موسسه تحقیقات شیلات ایران و مراکز تابعه حضور فعال و مشارکت سازنده داشته اند لذا می توان اینگونه بیان نمودکه این مطالعه با این ابعاد و ویژگی ها در ایران و جهان برای اولین بار صورت پذیرفت .

[1]-Grey Mullet Nervous Necrosis Virus

۱-کلیات

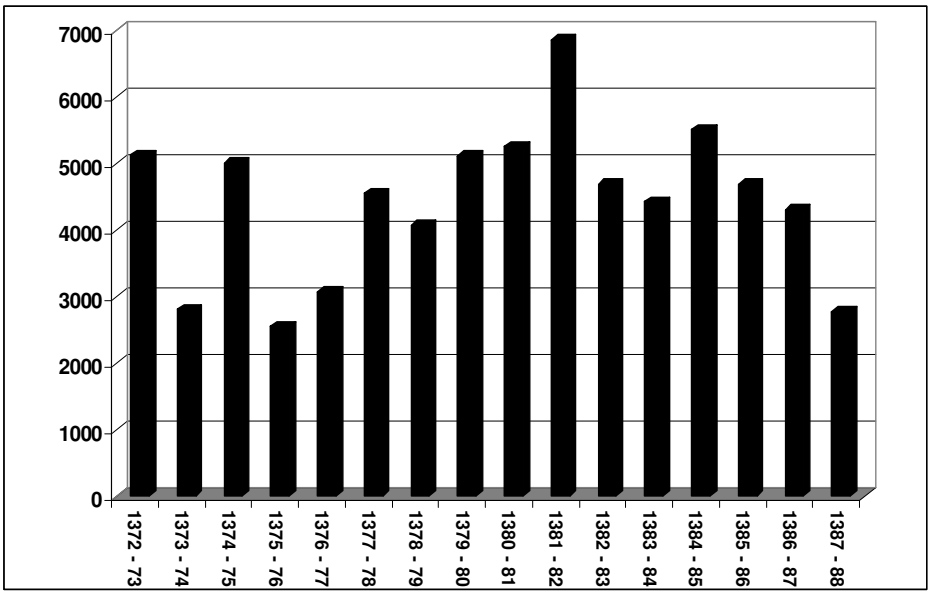
۱-۱- ماهیان استخوانی

در دریای خزر بیش از ۱۲۲ گونه و زیرگونه ماهی زیست می‌کنند که برخی از محققین تاکنون حدود ۱۰۰ گونه ماهی را در حوضه جنوبی دریای خزر نام برده اند ولی در مجموع ۸۱ گونه و زیر گونه ماهی شناسایی شده است که متعلق به ۵۲ جنس، ۱۷ خانواده و ۱۰ راسته می باشند. از مجموع گونه های شناسایی شده حدود ۳۰ گونه ساکن در آب شیرین بوده و مابقی گونه ها ساکن در آب لب شور و یا مهاجر از دریا به رودخانه هستند که از این تعداد حدود ۳۰ گونه به عنوان ماهیان استخوانی در دریای خزر مطرح می باشند (برنامه راهبردی تحقیقات محصولی ماهیان استخوانی و کیلکا- موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۳۸۸).

۱-۱-۱-کفال ماهیان

کفال ماهیان یکی از مهمترین، اقتصادی ترین و با ارزشترین ذخایر ماهیان استخوانی حوضه جنوبی دریا خزرمی باشند بطوریکه بعد از ماهی سفید بیشترین سهم صید ماهیان استخوانی را به خود اختصاص میدهند. در پنج سال گذشته کفال ماهیان بطور میانگین ۲۷/۸٪ از ترکیب صید ماهیان استخوانی را به خود اختصاص داده اند (دریانبرد ۱۳۸۷).

طی دو دهه اخیر میزان روند صید کفال ماهیان در سال ۱۳۸۱ به بالاترین حد خود معادل ۶۴۴۶ تن در دریای خزر رسید، این در حالی است که بعد از آن صید این ماهی با روند کاهشی در کشور روبرو بوده است. (میزان ۴۰۰۰ تن در سال ۱۳۸۲ و حدود ۲۷۸۰ تن در سال ۱۳۸۷) (نمودار۱- بخش بیولوژی و ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۳۸۹)



نمودار ۱ - میزان صید کفال ماهیان طی سالهای ۱۳۸۸ - ۱۳۷۲
(آمار بخش بیولوژی و ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۳۸۹)

مشخصات این ماهیان عبارتند از:

- کفال ماهیان دارای بدنی دراز و کشیده هستند.
- معمولاً دارای پلک سوم هستند.
- حفره دهانی عرضی است.
- دارای فلس بزرگ شانه ای یا دایره ای هستند که تا روی سر را پوشش می دهد.
- فاقد خط جانبی هستند.
- این ماهیها دارای سنگدان هستند.
- باله های شکمی آنها در قسمت تحت شکمی قرار دارند.
- دارای ۲ باله پشتی جدا از هم هستند.
- دارای روده بلندی هستند.
- فاقد دندان هستند.
- دارای کیسه شنای یک قسمتی هستند.

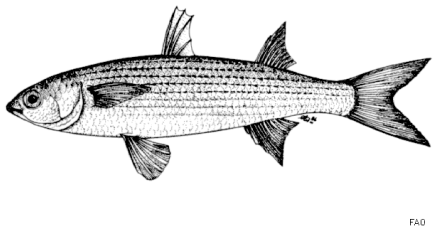
جنس های کفال ماهیان :

- لیزا (Liza)
- موجیل(Mugil)

۲-۱-۱- گونه های کفال ماهیان:

کفال ماهیان در هرسه حوضه آبی کشور پراکنش دارند در دریای خزر سه گونه وجود دارد که شامل :

- **کفال پوزه باریک** (*Liza saliens*,Risso,1810)



تصویر شماره ۱: ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*)

این ماهی نسبت به کفال طلائی دارای پوزه و سر باریکتری است. فلسهای روی سر از سوراخهای بینی گذشته و تا نوک پوزه ادامه دارد. ساقه دمی آن نسبت به کفال طلائی کوتاهتر و باریکتر است.
تعداد خارهای آبششی بر روی اولین کمان آبششی ۸۵-۶۵ عدد، تعداد زوائد پیلوریک ۹-۷ عدد که سه عدد آنها بزرگ و مابقی آنها کوتاه است در تمامی سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد. تعداد زیادی از آنها در جنوب شرقی دریای خزر مخصوصاً تالاب گمیشان و خلیج گرگان همیشه وجود دارند.

- **کفال طلائی** (*Liza auratus*, Risso,1810)

تصویر شماره ۲: ماهی کفال طلائی(*Liza auratus*)

تعداد خارهای آبششی ۱۵۰-۱۴۰ عدد، سر پهن، فلسهای روی سر تا دومین سوراخ بینی وجود دارد. دارای لکه های طلائی بر روی سرپوش آبششی، فلسها دارای یک شکاف در قسمت پایینی مرکز فلس می باشند. دارای ۹-۷ عدد زائده پیلوریک هستند که همگی آنها دارای اندازه مساوی و بزرگ بوده و بر روی سنگدان قرار دارند.
این ماهی گرما دوست می باشد و بصورت گروهی در آبهای شور، لب شور دریا و دهانه رودخانه ها زندگی می کند. در سراسر حوضه جنوبی دریای خزر و دهانه رودخانه ها وجود دارد.

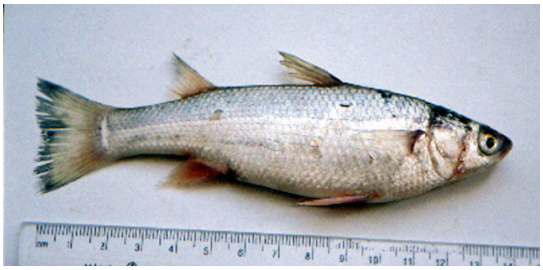
- **کفال خاکستری** (***Mugil cephalus***, **Linnaeus, 1758**):

تصویر شماره ۳: ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) یا Grey mullet

تعداد خارهای آبششی ۱۵۰-۱۴۰ عدد، دارای دو عدد زوائد پیلوریک، فلسهای روی سر تا نوک پوزه وجود دارد، پشت بدن خاکستری و دارای لکه های تیره روی باله های سینه ای، ۱۲ نوار طولی تیره رنگ در دو طرف بدن وجود دارد. رنگ سرپوش آبششی نقره ای است.

در آبهای شور، لب شور و دهانه رودخانه مشاهده می شود. برای حوزه جنوبی دریای خزر یک گونه غیر بومی است و بصورت کنترل شده در منطقه گمیشان نگهداری می شود.

در آبهای داخلی یک گونه به نام *Liza abu* (Hechel, 1843) وجود داردکه دارای ۴ زائده باب المعدی است و در آب شیرین زندگی می کند.



تصویر شماره ٤: ماهی (*Liza abu*) یا Abu mullet تصویر از Yalcin-Ozdilek, Sukran

در مناطق جنوبی کشور هم یک گونه به نام *Liza dussumieri*, (Cuvier & Valenciennes, 1836) وجود دارد که به گونه های کوچک مید و به گونه های بزرگ بیاه گویند.

در خلیج فارس و دریای عمان نیز گونه ای به نام *Liza klunzingeri* زندگی می کند که دارای ارزش اقتصادی قابل توجهی در جنوب کشور و کشورهای عربی همسایه جنوبی است.

تصویر شماره ۵: ماهی *Liza klunzingeri* تصویر از Randall, J.E.

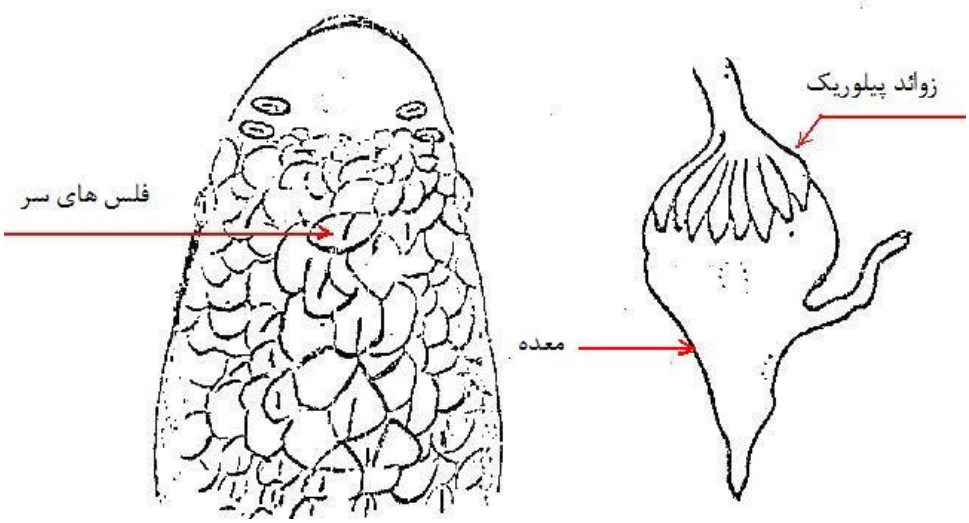
دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک در اصل جز ماهیان بومی دریای خزر نبوده اند بلکه طی سالهای ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ (۱۳۱۳ – ۱۳۰۹ شمسی) توسط روس ها از دریای سیاه به دریای خزر پیوند زده شدند.

طی این سالها بچه ماهیان سه گونه کفال طلایی، کفال پوزه باریک و کفال خاکستری از دریای سیاه به دریای خزر آورده شدندکه پیوند دو گونه طلایی و پوزه باریک بخاطر گرمتر بودن آب دریای خزر نسبت به دریای سیاه، منابع غذایی مناسب و نیز وجود مناطق کم عمق تر که مورد پسند این ماهیان برای زندگی است موفقیت آمیز بود و در مدت کوتاهی بخوبی با شرایط اکولوژیکی دریای خزر سازگار شدند و از پراکنش خوبی نیز برخوردار گردیدند (اصلان پرویز ۱۳۷۰، حمید خسروی راد ۱۳۷۳). پیوندگونه سوم(کفال خاکستری) به دریای خزر موفقیت آمیز نبود و این ماهی قابلیت سازگاری با شرایط اکولوژیک دریای خزر را نداشت ولی در عوض ذخایر بسیار مناسبی از این گونه درآبهای جنوب کشور وجود دارد و از منابع مهم شیلاتی کشور محسوب می گردد. همچنین از این گونه به عنوان یکی از پنج گونه مهم افتصادی دریای سرخ و سواحل مدیترانه نام برده شده است (Ucko و همکاران، ۲۰۰۴).

دو گونه مذکور در کمتر از ۱۰ سال در تمام مناطق دریای خزر گسترش یافتند و جمعیتهای بسیار چشمگیری را در جنوب دریای خزر تشکیل دادند. از این دو گونه کفال پوزه باریک مناطق جنوبی و کفال طلایی مناطق شمالی را برگزیدند (اصلان پرویز ۱۳۷۰، خسروی راد ۱۳۷۳).

۳-۱-۱-کلیات مربوط به شناسایی کفال طلایی و پوزه باریک

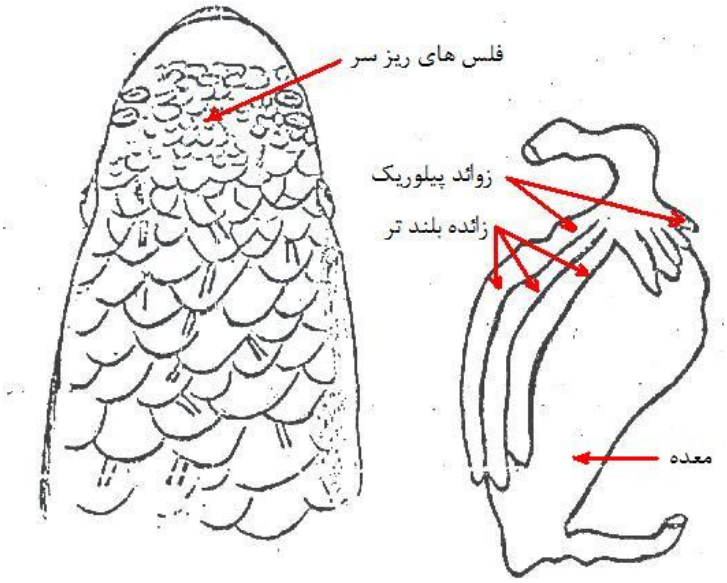
- **کفال طلایی** *Liza uratus*
  - سر این ماهی کمی پهن و نیم رخ آن گرد است
  - پوزه این ماهی تا انتهای عقبی بینی از فلس پوشیده شده است.
  - در این ماهی فلسهای سر تقریبا هم اندازه سایر فلسهای بدن می باشد، با این اختلاف که فلسهای سر از فلسهای پشت و کنار پوزه بزرگتر است.
  - زوائد پیلوریک در این ماهی ۸ و گاهی ۷ یا ۹ عدد است و تمام آنها کوتاه و تقریبا هم اندازه می باشند(خسروی راد ۱۳۷۳، شعبانی ۱۳۷۴)



تصویر شماره ٦: وضعیت زوائد پیلوریک و فلس سر در کفال طلایی

کفال پوزه باریک *Liza saliens*

- سر و پوزه آن باریک است.
- فلسهای سر و قسمت انتهایی پوزه ریزتر از فلسهای سایر قسمتهای بدن است.
- فلسهای ریز در سر در ابتدا قسمت پشتی نیز مشاهده میشود.
- زوائد پیلوریک ۷ – ۸ عدد بوده و طول سه عدد آنها بسیار بلندتر از سایرین و تقریبا هم اندازه معده است(خسروی راد ۱۳۷۳، شعبانی ۱۳۷۴)



تصویر شماره ۷: وضعیت زوائد پیلوریک و فلس سر در کفال پوزه باریک

٤-۱-۱-اختصاصات اکولوژیک و بیولوژیک کفال ماهیان دریای خزر

محیط زندگی

بطور کلی ماهیان آبهابی ساحلی هستند و در تمام عمر در دریا زندگی میکنند و برای تخم گذاری احتیاج به آب شیرین رودخانه ندارند. این آبزی از ماهیان نسبتا خشن است و به کمک اولین شعاع سخت باله پشتی از خود دفاع کرده و دیگر ماهیان را از محدوده خود دور می نماید. بصورت اجتماعی زندگی میکنند و در اجتماعات آنها ماهیان دیگر یافت نمی شوند(خسروی راد ۱۳۷۳).

مهاجرت

کفال ماهیان ماهیانی مهاجر بوده و برای زمستان گذرانی از قسمتهای میانی و شمالی دریای خزر به قسمتهای جنوبی مهاجرت میکنند. کفال طلایی که گونه ای گرما دوست محسوب میشود سواحل ایران را برای زمستان گذرانی برگزیده و به این منطقه مهاجرت میکند. مهاجرت این ماهی همزمان با شروع فصل صید ماهیان استخوانی در ایران بوده و به این ترتیب بیشترین بهره برداری از ذخایر آن در ایران انجام میشود(اصلان پرویز ۱۳۷۰، دریانبرد و همکاران ۱۳۸۷).

تحمل شوری

کفال ماهیان به آسانی قادر به تحمل تغییرات شوری می باشند. این ماهیان در آبهای شیرین تا آبهای شور دریا (۳۸ در هزار) زیست می نمایند. البته گزارش هائی وجود دارد که آنها قادر به تحمل شوری بالاتر از ۱۰۰ در هزار نیز هستند(خسروی راد ۱۳۷۳).

تحمل حرارت و نیازمندی به اکسیژن

این ماهیان بسیار به تغییرات حرارتی حساس هستندو به سختی قادر به تحمل سردی آب می باشند. این ماهیان گرما دوست بوده و قادر به تحمل حرارتهای کمتر از ۱۰ درجه سانتیگراد نیستند. بر خلاف دما، این گروه از ماهیان قادر به تحمل افت اکسیژن آب بوده و می توانند با ۲ میلی گرم بر لیتر اکسیژن نیز زنده بمانند(خسروی راد ۱۳۷۳).

تغذیه

در سنین مختلف، کفال ماهیان از تغذیه متفاوتی برخوردار هستند. اکثر گونه های کفال همه چیز خوار بوده و از بقایای گیاهی[1] ، گیاهان عالی آبزی، صدفها، حلزونها، کرمها، دو کفه ایها و پلانکتونها تغذیه میکنند. در زمان بلوغ جنسی و مهاجرت به وفور تغذیه کرده ولی در زمان تولید مثل تغذیه آنها قطع می شود. کفال ماهیان دارای یک سنگدان بسیار عضلانی و یک روده طویل هستند. از آنجایی که نوسانات فصلی و سالانه باعث تغییرات در تراکم مواد غذایی میگردد، تنوع غذایی آنها در مواقع مختلف متفاوت است. در تغذیه کفال ماهیان سه مرحله مشخص وجود دارد:

الف – مرحله لاروی: تغذیه فعال لارو این ماهیان از حدود ۵ روزگی پس از تفریخ آغاز میشود. در این زمان مهمترین منبع غذایی پلانکتونها هستند.

ب – مرحله انگشت قد: در زمانی که بچه ماهیان به mm ۵۵ – ۲۰ می رسند، تغذیه مخلوط (گیاهی و جانوری)دارند. تغذیه توام همراه با مصرف جانوران کفزی مختص به ماهیان یکساله و نزدیک یکسال است.

ج – بلوغ: کفالهای بالغ از جلبکهای کفزی و دتریت گیاهان تغذیه میکنند. به همین دلیل بطور معمول در دستگاه گوارش آنها دانه های بسیار ریز شن یافت میشود. این شنها در اصل به عنوان ساینده مواد غذایی خصوصا اجزا گیاهی عمل می کنند(خسروی راد ۱۳۷۳).

بلوغ و تخم ریزی

بلوغ جنسی در نرها و ماده ها متفاوت است و نرها زودتر از ماده ها به بلوغ می رسند، بطوریکه نرها در ۳ سالگی و ماده ها در ۴ سالگی بلغ میشوند(ترشنکو ۱۹۵۰). لیکن رشد ماهیان ماده سریعتر از نرها است و در سنین ۴ تا ۵ سالگی ماده ها از نظر طولی به اندازه نرهای ۵ تا ۶ سال هستند. بطور متوسط ماده ها در گله های کفال طلایی ۸۲٪ و در کفال پوزه باریک ۸۶٪ میزان صید را بخود اختصاص میدهند. حداکثر سن ماهیان نر در هر دو گونه ۲ تا ۳ سال با ماده ها تفاوت دارد و کمتر از مرز سنی ماهیان ماده گزارش شده است. این موضوع کوتاهی چرخه زندگی و درصد بالای مرگ و میر نرها را در مقایسه با ماده ها نشان می دهد(خسروی راد ۱۳۷۳).

---

[1] - Detritus

این ماهیان را نمی توان کاتادراموس حقیقی دانست ولی در زمان تخم ریزی از نواحی ساحلی و خلیج ها بطرف مناطق عمیق تر دریا مهاجرت میکنند. از اختصاصات کفال ماهیان دریای خزر میتوان به رشد نسبتا سریع و فعال گامتهای جنسی اشاره نمود. بطوریکه در ماده ها عبور از مرحله ۲ به ۴ رسیدگی جنسی ۱/۵ تا ۲ ماه بطول می انجامد(خسروی راد۱۳۷۳، ترشنکو ۱۹۵۰). محل های تخم ریزی کفال پوزه باریک در خزر جنوبی و میانی است در حالیکه تخم ریزی کفال طلایی عمدتا در خزر میانی است. علت این اختلاف تفاوت دمایی است. زیرا تخمریزی کفال طلایی در درجه حرارت ۲۲ – ۲۰ درجه سانتیگراد صورت میگیرد ولی این دما برای کفال پوزه باریک ۲۹ – ۲۵ درجه سانتیگراد است. معمولا مکانهای تخمریزی در فاصله ۱۵ – ۵ متری از سطح آب صورت میگیرد زیرا تخمها برای تفریخ نیاز به آب شور دارند. (شریعتی ۱۳۷۱، خسروی راد ۱۳۷۳).

قدرت باروری این ماهیان بسیار زیاد است. بطوریکه هماوری مطلق ماهیان کفال طلایی که دارای طول ۲۵ تا ۳۰ سانتیمتر باشد بطور میانگین ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار تخم بوده و این مقدار برای ماهیان بزرگتر با طول ۴۵ تا ۵۰ سانتیمتر به ۲ تا ۳ میلیون میرسد. مقدار هماوری با افزایش طول ماهی افزایش می یابد(کودلینا ۱۹۵۹).

تخمها ریز و پلاژیک بوده و قطری در حدود ۰/۶ تا ۰/۹ میلیمتر و حتی ۱ میلی متر دارندکه در سطح آب و در اعماق ۴۵ تا ۱۶۰ سانتیمتری شناور می باشند(برگ ۱۹۵۶، شریعتی ۱۳۷۱). رشد نموجنینی در عرض ۳۶ تا ۴۸ ساعت در لایه های سطحی آب به اتمام می رسد. دوره جنینی بسیار کوتاه است و ۲۴ ساعت بعد از لقاح و در آب با دمای ۲۱ درجه سانتیگراد، بدن جنین بند بند شده و چشمها نمایان میشود. در ۲۴ ساعت بعدی تفریخ انجام شده و طول لارو به حدود ۲/۴ میلیمتر می رسد(دریانبرد ۱۳۸۷). جهت اطلاعات بیشتر به نشانی وبگاه های ذیل می توان مراجعه کرد:

http://www.fishbase.org/summary/speciessummary.php?id=1736
http://www.ag.auburn.edu/fish/image_gallery/d...

۲-۱- معرفی بیماری

بیماری آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی[1] (VER) (Munday و همکاران، ۱۹۹۲ و OIE ، ۲۰۰۶) که همچنین به عنوان آنسفالیت ویروسی[2] Sea bass (Bellance و Gallet، ۱۹۸۸؛ Bovo ، ۲۰۰۷)، نکروز عصبی ویروسی[3] (Yoshikoshi و Inoue ، ۱۹۹۰)، آنسفالیت توربوت[4] (Bloch و همکاران ۱۹۹۱) و آنسفالیت ماهی[5] (Comps و همکاران، ۱۹۹۶) معرفی شده است یک بیماری عصبی ناشی از نوعی ویروس متعلق به خانواده نوداویریده می باشد(Bovo ، ۲۰۰۷).

[1] - Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER)
[2]- Viral Encephalopathy
[3]- Viral Nervous Necrosis (VNN)
[4]- Turbot encephalopathy
[5]- Fish encephalitis

اولین معرفی کامل این بیماری در سال ۱۹۸۸ توسط Bellance و Gallet در بررسی تلفات شدید لارو و بچه ماهیان پرورشی ماهی *Sea bass* اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) در فرانسه انجام شده اما Glazebrook و Campe، ۱۹۸۷ تلفات مشابهی را در *Sea bass* آسیایی (*Lates calcarifer*) با ضایعات مغزی گزارش نمودند که به احتمال زیاد ناشی از عفونت نوداویروسی بوده است.

بر اساس گزارش سازمان بین المللی بیماریهای همه گیر (OIE ، ۲۰۰۶) تمامی تلفات شدید ماهیان دریایی که دارای علایم مغزی بهمراه حضور ذرات ویروسی از خانواده نوداویریده باشند را باید به عنوان یک بیماری واحد با نام نکروز عصبی ویروسی (VNN) یا آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی (VER) نامید. ویروس این بیماری اولین بار توسط Yoshikoshi و Inaue در سال ۱۹۹۰ از طوطی ماهیان(*Oplegnathus fasciatus*) Parrotfish بیمار در کشور ژاپن جداسازی و شناسایی شد.

۱-۲-۱- خصوصیات عامل بیماری و سویه های ویروس

عامل بیماری ویروسی از جنس بتا نوداویروس ها است. یک ویروس RNA دار ، تک رشته ای Positive Senses است که فاقد غشا بوده و کپسید آن تقارن هشت وجهی دارد. ژنوم آن دو قطعه ای(RNA_1 و RNA_2) است که هر دو آنها پلی آدنیله هستند. این ویروس اندازه کوچکی داشته و قطری در حدود ۳۰ – ۲۵ نانومتر دارد. RNA_1 مسئول تولید ماده ژنتیکی ویروس و RNA_2 مسئول تولید کپسید ویروس می باشد. این ویروس در حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد پس از ۳۰ دقیقه غیر فعال می شود. در برابر pH اسیدی و قلیایی مقاوم بوده و به دلیل نداشتن غشا در برابر حلالهای آلی نیز مقاوم است. در برابر اتانل ۶۰٪ و متانول ۵۰٪ حساس است(طی ۱۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد). در حضور مواد ضد عفونی کننده ای چون هیپوکلریت سدیم و کلسیم، بنزالکانیوم کلراید و محلولهای ید دار در غلظت ۵۰ppm پس از ۱۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراداز بین میرود. تاکنون اطلاعاتی در مورد چگونگی بقا ویروس در محیط بدست نیامده است (موری و همکاران ۱۹۹۲، OIE ۲۰۰۰، فوکوئت ۲۰۰۵).

بیماری نکروز عصبی ویروسی توسط ذرات ویروسی که قبلا عضو خانواده پیکورنا ویریده طبقه بندی می شدند(Glazebrook و همکاران، ۱۹۹۰) و توانایی ایجاد ضایعات عصبی مشابهی در گونه های مختلف ماهیان را دارند ایجاد می شود. براساس خصوصیات بیوشیمیایی اسید نوکلئیک و پروتئین های ساختمانی ذرات ویروسی بدست آمده از لارو Striped jack (*Pseudocaranx dentex*) (Mori و همکاران، ۱۹۹۲) و بافت مغز *Sea bass* اروپایی *Dicentrarchus labrax* و *Sea bass* آسیایی *Lates calcarifer* (Comps ، ۱۹۹۴)، این ذرات ویروسی به طور قطعی در خانواده نوداویریده قرار دارند که شامل دو جنس آلفا و بتانودا ویروس می باشند. جنس آلفانوداویروس به صورت اولیه حشرات را تحت تاثیر قرار می دهد مثل نوداموویروس (NOV)، ویروس

Blackbeetle (BBV)، ویروس Flock House (FHV) و ویروس Boolarra (BOV) و جنس بتانوداویروس که شامل ۴ گونه است ماهیان را مبتلا می کند. (Carstens و همکاران، ۲۰۰۰؛ Schneemann و همکاران، ۲۰۰۵).

ذرات ویروسی متعلق به جنس بتانوداویروس کوچک (۳۰-۲۵) نانومتر ، بدون پاکت[۱] و بیست وجهی می باشند (Glazebrook و همکاران ، ۱۹۹۰ ؛ Bloch و همکاران، ۱۹۹۱). از نظر ژنومی شامل دو قطعه RNA تک رشته ای، Positive Senses می باشد که RNA_1 (۳/۱ kb) یک پروتئین غیرساختمانی به نام پروتئین A (۱۰۰ KD) که همان RNA پلی مراز وابسته به RNA است را کد کرده و RNA_2 نیز پروتئین کپسید را کد می کند.(Mori و همکاران، ۱۹۹۲ ؛ Comps و همکاران، ۱۹۹۴). بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیکی ناحیه T_4 در ژنوم بتانوداویروس ها که پروتئین کپسید را کد می کند، بتانوداویروس ها در ۴ ژنوتیپ و ۴ گونه قرار داده می شوند:

در حال حاضر این ویروس بر اساس سکانس نوکلئوتیدهای ژن کد کننده پروتئین کپسید به چهار ژنوتیپ تقسیم می شود که شامل:

۱ – ویروس نکروز عصبی جک راه راه[۲] (SJNNV)

۲ – ویروس نکروز عصبی جک بادکنکی ببری[۳] (TPNNV)

۳ – ویروس نکروز عصبی کفشک (فلاندر) بارفین[۴] (BFNNV)

۴ – ویروس نکروز عصبی هامور خال قرمز[۵](RGNNV) (Nishizawa و همکاران ۱۹۹۷، Skliris و همکاران ۲۰۰۱، ۲۰۰۱، Ikenaga و همکاران ۲۰۰۲)

از میان TPNNV ، SJNNV ، BFNNV و RGNNV (Nishizawa و همکاران ۱۹۹۷). جدایه های SJNNV و TPNNV به ترتیب از (*Pseudocaranx dentex*) Striped jack و (*rubripes Takifugu*) Tiger puffer بدست آمده اند و ژنوتیپ RGNNV از شانک خال قرمز، (*Epinephelus akaara*) Red-spotted grouper جدا شده که می تواند بسیاری از گونه های ماهیان گرمابی را مبتلا کند (Skliris و همکاران، ۲۰۰۱). در حالیکه ویروس جداشده از ماهیان آب سرد عمدتا در دسته BFNNV قرار داده می شوند که به صورت اولیه از نوعی کفشک ماهی، (*Verasper moseri*) Barfin flounder گزارش شده است. (Dannevig و همکاران، ۲۰۰۰؛ Starkey و همکاران، ۲۰۰۱).

اخیرا آنالیزهای سرولوژیکی، موجب تشخیص ۳ سروتیپ ویروسی شده است. سروتیپ های A و B به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های SJNNV و TPNNV و سروتیپ C مربوط به ژتوتیپ های RGNNV و BFNNV است که این مساله شباهت توالی ژنی RNA_2 در این دو ژنوتیپ را نشان می دهد(Mori و همکاران، ۲۰۰۳).

۱- Envelope

1- Striped jack Nervous Necrosis Virus

2 -Tiger puffer Nervous Necrosis Virus

3- Barfin flounder Nervous Necrosis Virus

4 - Red – spotted grouper Nervous Necrosis Virus

۳-۱- اپیدمیولوژی بیماری

۱-۳-۱- میزبانهای حساس و پراکندگی جغرافیایی

بیماری نکروز عصبی ویروسی یک بیماری جهان گستر بوده و جز قاره آفریقا از تمام قاره ها گزارش شده است(OIE ، ۲۰۰۷) .این بیماری به عنوان یک تهدید اقتصادی جدی در صنعت پرورش ماهیان دریایی مطرح می باشد(Le Breton و همکاران، ۱۹۹۷؛ Munday و Nakai ، ۱۹۹۷ ؛ Munday ،۲۰۰۲). تاکنون بیماری از بیش از ۴۰ گونه مختلف بویژه ماهیان دریایی گزارش شده است(Bovo و همکاران ۲۰۰۷ ؛ Gomez و همکاران، ۲۰۰۶).

و در این میان گروه زیادی از ماهیان دریایی پرورشی به چشم میخورند که می توان به انواع هالیبوت (*Hippoglossus* sp.)، انواع گروپر(*Epinephelus* sp.)، باس دریایی استرالیایی(*Lates calcarifer*)، باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*)، ماهی توربوت(*Scophthalmus maximus*)، فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، رد دروم(*Sciaenops ocellatus*)، فلاندر زمستانی(*Pseudopleuronctes americanus*)، جک راه راه (*Pseudocaranx dentex*)، ماهی کاد اطلس(*Gadus morhua*)، ماهی روغن خالدار(*Melanogrammus aeglefinus*) و نیز بعضی از ماهیان آب شیرین مانند گوپی (*Poicelia reticulate*) و گورامی(*Trichogaster trichopterus*) اشاره نمود(Mundday و همکاران ۲۰۰۲، OIE ۲۰۰۰، Hegde و همکاران ۲۰۰۵، Buchan و همکاران ۲۰۰۶). بعلاوه برخی از گونه های مهم مانند شانک Sea bream (*Sparus aurata*) که تاکنون گونه مقاوم در برابر این بیماری محسوب می شدند به دلیل مواردی از وقوع همه گیری های نگران کننده اخیر بیماری، به طور جدی تهدید می شوند(Beraldo ، ۲۰۰۷ ؛ Bovo و همکاران- نتایج منتشر نشده).

بیماری نکروز عصبی ویروسی به طور گسترده در جنوب شرقی آسیا گزارش شده است (Yoshikoshi و Inoue، ۱۹۹۰ ؛ Mori و همکاران،۱۹۹۱ ؛ Nakai و همکاران، ۱۹۹۴ ؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۴ ؛ Chua و همکاران، ۱۹۹۵ ؛ Danayadol و همکاران، ۱۹۹۵ ؛ Muroga و همکاران، ۱۹۹۵ ؛ Fukuda وهمکاران، ۱۹۹۶ ؛ Jung و همکاران ۱۹۹۶ ؛ Chi و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Zafran و همکاران، ۱۹۹۸ ؛ Zafran و همکاران، ۲۰۰۰ ؛ Chi و همکاران، ۲۰۰۱ ؛ Maeno و همکاران، ۲۰۰۲ ؛ Chi و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ Hegde وهمکاران، ۲۰۰۳) و همچنین از منطقه مدیترانه نیز گزارش های متعددی وجود دارد

(Breuil و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Bovo و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Sweetman و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Le Breton و همکاران، ۱۹۹۷؛ Thiery و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ Maltese و همکاران، ۲۰۰۵). این بیماری در دریای شمالی نیز وجود دارد(Bloch و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Grotmol ، ۱۹۹۵). بتانوداویروس از ماهیان پرورشی انگلستان (Starkey ، ۲۰۰۰ و ۲۰۰۱)، آمریکای شمالی(Curtis و همکاران، ۲۰۰۱؛ Barker ،۲۰۰۲ ؛ Gagne ، ۲۰۰۴) ، هند(Azad ، ۲۰۰۵) و رژیم اشغالگر قدس (Ucko و همکاران ، ۲۰۰۴) نیز گزارش شده است.

علی رغم این واقعیت که بیماری مختص ماهیان دریایی است اما گاهی از ماهیان آب شیرین مانند مارماهیان *Anguilla anguilla* (Chi و همکاران، ۲۰۰۳)، گوپی *Poecilia reticulata* (Hedge و همکاران، ۲۰۰۳)، *Parasilurus asotus* (Chi وهمکاران، ۲۰۰۳)، چالباش *Acipenser gueldenstaedti* (Athanassopoulou و همکاران، ۲۰۰۴)، *Tandanus tandanus* و *Oxyeleotris lineolatus* (Munday و همکاران، ۲۰۰۲) و گورامی(*Trichogaster trichopterus*) نیز گزارش شده است.

همچنین این بیماری به صورت تجربی در تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) (Skliris و Richards ، 1999b) و medaka (*Oryzias latipes*) (Furusawa ، ۲۰۰۶) ایجاد شده است. تنوع پراکندگی بیماری در آبهای با شوری مختلف نشانگر این است که شوری (Salinity) عامل تعیین کننده ای در وقوع بیماری محسوب نمی شود.

بر اساس آخرین مکاتبه با Prof.Bovo و بر مبنای یک مطالعه پرسشنامه ای بین المللی که توسط ایشان در کنفرانس 15th EAFP International Conference on Diseases of Fish & Shellfish که در سپتامبر ۲۰۱۲ در کشور کرواسی برگزار گردید، بیماری VNN به عنوان اصلی ترین مشکل بهداشتی در آبزی پروری منطقه مدیترانه قلمداد گردید(مکاتبات شخصی نگارنده ، شهریور ۱۳۹۰).

۲-۳-۱- راه های انتقال بیماری

راه انتقال بیماری به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم انجام می شود. در حالت مستقیم، ویروس به دو شکل عمودی و افقی منتقل میشود. در مسیر عمودی ماهیان مولد از طریق مایعات تناسلی خود ویروس را به سلول تخم منتقل می نمایند.ماهیان مولد به عنوان یکی از مخازن اصلی بیماری قلمداد می گردد. ویروس VNN در گنادها، روده، معده، کلیه و کبد ماهیان مولد حامل شناسائی شده است. تکثیر ویروس در تخمدان های ماهیان مولد ، پس از تخمریزی موجب انتقال عمودی بیماری می شود (Mushiake و همکاران، ۱۹۹۲ ، Nguyen و همکاران، ۱۹۹۷).

لیکن در روش افقی قرار گرفتن ماهیان سالم در کنار ماهیان بیمار موجب انتقال بیماری است. از طرفی آلودگی از طریق غذاهای زنده آلوده همچون آرتمیا،کوپه پودا و زوائد غذائی (Trash fish) آلوده به ویروس VNN، یکی دیگر از راههای انتقال افقی بیماری است. انتقال افقی بیماری از طریق ماهیان مبتلا و بدون علائم بالینی مشخص (Asymptomatically infected fish) نیز می تواند در محیط های دریائی اتفاق افتد (Gomez و همکاران، ۲۰۰۴).

همچنین مشاهده شده است که بیماری در لارو جک راه راه و ماهیان نورس گروپر خال قرمز بعد از غوطه وری در آب آلوده ایجاد شده است. در فرم غیر مستقیم ویروس از طریق پساب و وسایل مخصوص نقل و انتقال ماهی منتقل می شود (Bovo و همکاران ۱۹۹۹، OIE ۲۰۰۰، Hegde و همکاران ۲۰۰۲).

۳-۳-۱- نحوه انتقال بیماری

مطالعات کاربردی متعدد و بررسی های تجربی در شرایط کنترل شده انتقال افقی را کاملا ثابت کرده است(Glazebrook و همکاران، ۱۹۹۰ ؛ Mori و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Arimoto و همکاران، ۱۹۹۳ ؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۴ و ۱۹۹۶ ؛ Thiery و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ Peducasse و همکاران، ۱۹۹۹ ؛ Totland و همکاران، ۱۹۹۹).

برخی محققین احتمال انتقال عمودی بیماری را مطرح کرده اند (Nguyen و همکاران، ۱۹۹۷؛ Johansen و همکاران، ۲۰۰۲) اما برخی دیگر انتقال عمودی را مهمترین راه پراکنش بیماری در جمعیت های پرورشی می دانند(Arimoto و همکاران ۱۹۹۲ ؛ Yoshimizu و همکاران، ۱۹۹۷؛ Breuil و همکاران، ۲۰۰۲).

برخی دیگر استفاده از غذای زنده تازه مانند آرتمیا(*Artemia salina*) ، *Tigriopus japonicus* ، *Acetesinte medius* و روتیفر *Brachionus plicatilis* را که معمولا در تغذیه لاروهای ماهیان دریایی استفاده می شوند را به‌عنوان یکی از راههای انتقال بیماری مطرح کرده اند(Skliris و Richards ، ۱۹۹۸ ؛ Chi و همکاران، ۲۰۰۳).

Mori و همکاران(۲۰۰۳) نیز استفاده از ماهی خام را در جیره غذایی به‌عنوان یک راه انتقال بیماری در مولدین اثبات کرده اندکه این مساله تاثیر کانیبالیسم را در درگیری های طبیعی در ماهیان وحشی نشان می دهد.

مقاومت بالای بتانوداویروس به شرایط محیطی بدون شک باعث باعث افزایش احتمال انتقال افقی بویژه در مناطق بومی و در زمان انتقال نوزادان از هچری به کارگاههای پرورشی ایجاد می گردد.

به اعتقاد برخی نویسندگان، انتقال عمودی بعنوان یک راه مهم انتقال ویروس در جمعیت های پرورشی محسوب گشته است (Arimoto و همکاران، ۱۹۹۲ ؛ Yoshimizu و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Breuil و همکاران، ۲۰۰۲). در بسیاری از مقالات به دلیل شیوع بالای بیماری در مراحل اولیه لاروی و نوزادای گونه های مختلف پرورشی با آب عاری از ویروس، انتقال عمودی به‌عنوان راه انتقال بیماری مطرح شده است. (Breuil و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Arimoto و همکاران، ۱۹۹۲ ؛ Comps و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Yoshimizu و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Grotmol و Totland ، ۲۰۰۰) اما هنوز این مساله به طور قطعی ثابت نشده است.

فرضیه انتقال عمودی بیماری همچنین به دلیل ردیابی ذرات ویروسی در گنادها و تخم لقاح یافته ماهی (*Pseudocaranx dentex*) Striped jack با کمک آزمایش ELISA (Arimoto و همکاران، ۱۹۹۲)، RT-PCR (Mushiak و همکاران، ۱۹۹۴، Nishizawa و همکاران، ۱۹۹۶ ، Dalle valle و همکاران، ۲۰۰۰ ، Breuil و همکاران، ۲۰۰۲) و IFAT (Nguyen ، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۷) مطرح شده است. همچنین ویروس از تخم‌های لقاح یافته حاصل از مولدینی که به صورت تجربی آلوده شده‌اند شناسایی شده است. (Breuil و همکاران، ۲۰۰۲) اگرچه بیماری از مولدین به تخم ها انتقال می‌یابد ولی بر اساس داده های موجود هنوز مشخص نشده که آیا بیماری در داخل تخمک‌ها و جود دارد یا بصورت آلودگی خارجی تخم ها در زمان تخمریزی ایجاد شده و موجب بیماری لاروها پس از تفریخ آنها می گردد.

٤-۳-۱- راههای ورود و گسترش عامل بیماری در بدن ماهیان مبتلا

در یک بررسی تجربی به روش حمام دادن در لاروهای ماهی جک راه راه (Striped jack) علائم واکوئولاسیون برای اولین بار در نخاع که در بالای کیسه شنا قراردارد مشاهده گردید. در مرحله بعدی واکوئولاسیون در مغز و سپس در شبکیه مشاهده گردید که این موضوع بیانگر آن است که نخاع به عنوان اولین مکان برای تکثیر ویروس VNN می تواند مطرح باشد.به بیان دیگر ویروس از نخاع بطرف مغز به حرکت درآمده و در نهایت در شبکیه مستقر می گردد (Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶).

در لاروهائی که بصورت طبیعی آلوده شده بودند، ویروس در سلول های اپی تلیال پوست و سپس در اپی تلیوم روده وهمزمان در مراحل اولیه عفونت VNN در سلول های عصبی سیستم عصبی مرکزی (CNS) شناسائی گردید (Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶).

تمایل ویروس VNN به بافت عصبی (Neurotropism) نشانگر آن است که ویروس مزبورجهت دستیابی به سیستم عصبی مرکزی از طریق اعصاب محیطی به دو روش ذیل عمل می کند:

- از طریق اعصاب سمپاتیک که به دستگاه گوارش متصل می باشد
- از طریق اعصاب حسی یا حرکتی که به سلول های اپی تلیوم پوست متصل می باشد

(Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶ ، Grotmol وهمکاران، ۱۹۹۹).

در ماهی هامور هفت خط (Seven-banded grouper) در مرحله پرواری امکان ابتلای بیماری از طریق مواجهه به روش داخل بینی (Pernasal) وجود دارد. ویروس VNN به اپی تلیوم بینی نفوذ کرده و سپس بطرف عصب بویائی[۱] و پیاز بویائی[۲] حرکت می کند و قطعه بویائی[۳] را در مغز مورد تهاجم قرار می دهد.

در نمونه های مواجهه شده از طریق تزریق داخل عضلانی ویروس VNN به سیستم اعصاب محیطی در بافت عضلانی وارد شده و از طریق آکسون آنها بطرف نخاع حرکت می کند.

ویروس VNN می تواند از طریق سیستم گردش خون محل تزریق نیز سیستم عصبی مرکزی را مورد تهاجم قرار دهد (Tanaka وهمکاران، ۲۰۰۴) .

۵-۳-۱- عوامل مستعد کننده بروز بیماری

سن و درجه حرارت آب، دو عامل اصلی مستعد کننده ماهیان در ابتلا و مرگ و میر آنها ناشی از این بیماری است. این بیماری موجب مرگ و میر شدید شده و اغلب میتواند تا ۱۰۰٪ موجب بروز تلفات در جمعیت لاروها و ماهیان نورس طی ۷ – ۴ روز پس از تفریخ گردد.بیماری بطور اساسی ماهیان حساس را در مراحل اولیه

---

[۱] - Olfactory nerve
[۲] - Olfactory bulb
[۳] - Olfactory lobe

زندگی مبتلا می سازد. زود هنگام ترین زمان بروز شناخته شده برای این بیماری در ماهی جک راه راه یک روز پس از تفریخ گزارش شده است. با افزایش سن میزان تلفات کمتر میگردد بطوریکه میزان تلفات در مرحله لاروی بیشتر از مرحله ماهی نورس است(Bovo و همکاران ۱۹۹۹، OIE ۲۰۰۰، Murogo و همکاران ۲۰۰۱، Oh و همکاران ۲۰۰۲، Hegde و همکاران ۲۰۰۵).

البته حساسیت بالای ماهیان در مراحل اولیه زندگی(مراحل لاروی و نورس) به این معنی نیست که ماهیان بالغ در اثر این بیماری متحمل تلفات نمی شوند(Bovo و همکاران ۱۹۹۹).

از جمله ماهیان بالغی که گاهی مواقع بیماری VNN در آنها رخ می دهد می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

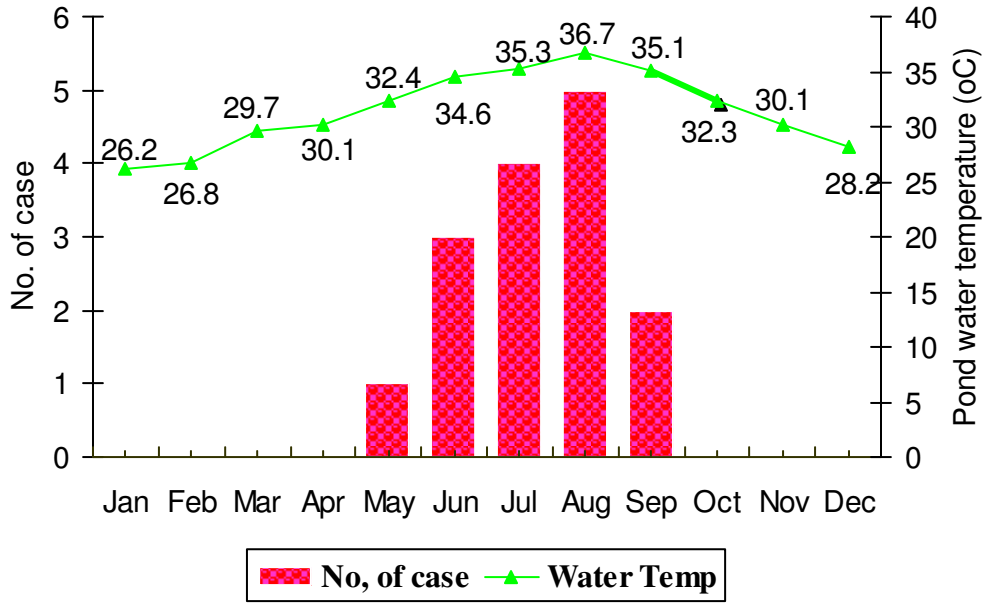
- Brown grouper (*E. malabaricus*) (Bloch & Schneider),
- Seven-banded groupers (*E. septemfasciatus*) Thunberg,
- Greasy grouper (*E. tauvina*) (Forsskal)
- Cobia (*Rachycentron canadum*) (L.)
- Euorpean eel (*Anguilla anguilla*) (L.)
- Golden grey mullet,(*Liza auratus*) in Iran

به غیر از سن، درجه حرارت آب نیز یکی از عوامل مستعد کننده بروز بیماری است، بطوریکه بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری در تابستان رخ میدهد.

در یک بررسی لاروهایی که به طور دائم در دمای ۲۸ درجه و در معرض این ویروس قرار داشتند در عرض ۱ روز ۸۰٪ تلفات دادند . اما در دمای زیر ۲۰ و بالای ۳۷ حتی در محیط کشت سلولی هم علائمی مشاهده نشد(. Chi و همکاران، ۲۰۰۳).

همچنین در مطالعه دیگری بر روی ماهی *E.akaara* جوان تلفات در دمای ۲۸-۲۴ درجه به ۱۰۰٪ رسید و در دمای ۲۰ به ۶۱ -۵۷ ٪ کاهش یافت و علائم مثل بروز شنای غیر عادی و مرگ ومیر به تأخیر افتاد و می توان گفت که آنتی ژن ویروس درماهیان زنده در دمای ۱۶ درجه پس از ۵۰ روز مشخص شد(Gilda D. Lio-Po و Leobert D. de la Pena ، ۲۰۰۴).

لذا به نظر می رسد درجه حرارت نفش زیادی در بقاء ویروس و شیوع بیماری نکروز عصبی دارد(Arimoto و همکاران ۱۹۹۴، Fukuda و همکاران ۱۹۹۶، Le Berton و همکاران ۱۹۹۶، Chi و همکاران ۱۹۹۷، Chi و همکاران ۱۹۹۹).



نمودار شماره۲ : رابطه میان درجه حرارت آب استخرها و میزان وقوع همه گیری های VNN در کشور ویتنام در سال ۲۰۰۵، (Chi, 2005)

٤-۱- تشخیص بیماری

۱-٤-۱- علایم بالینی

مهمترین مشخصه بیماری در گونه های مختلف رفتار شنای غیر طبیعی(مارپیچی، چرخشی و خوابیده به پشت در سطح آب)، تیرگی رنگ، باد کردگی کیسه شنا و تلفات است که عمدتا در بچه ماهیان و ماهیان جوان رخ می دهد و بسته به سن و گونه ماهی اشکال متفاوتی دارد(Munday و همکاران، ۲۰۰۲). در ابتلای دو طرفی متقارن ممکن است که ماهی در خط مستقیم و نزدیک به سطح آب شنا کند یا در صورتی که مدت طولانی دچار عدم تعادل (Ataxia) باشد در مسیر دایره ای و با بیحالی شنا می کند. ماهیان مبتلا قادر به شنا در یک مسیر مستقیم نمی باشند. شنای ماهیان یا بصورت مارپیچی است و یا به نوعی به دور خود می چرخند. در مواردی ماهی با سرعت شنا نموده و مانندارت پرتاب می شود(Darting) ولی ناگهان بیحال شده و به قعر آب میرود و یا اینکه به حالت بیحالی به سطح آب می آید و دوباره با سرعت به اطراف به حالت نیزه ای حرکت می کند.

در بسیاری از موارد ماهیان به یک پهلو افتاده ودر سطح آب غوطه ور و بکندی شنا میکنند. در برخی مواقع در وضعیت عمودی به صورت ساکن بر روی سر و در نزدیکی سطح آب می ایستد به طوری که باله دمی در بالای سطح آب قرار دارد و یا درحالیکه شکم به سمت بالا است به آرامی در سطح آب شنا می کند. گاهی مشاهده شده که ماهی بیمار در نزدیکی سطح آب و در خط مستقیم به سرعت شنا کرده و قادر به توقف کردن پیش از

برخورد به دیواره تانک نمی باشد به همین دلیل زخم های فک و پوزه در آنها مشاهده می شود. سایر علایم غیر اختصاصی مانند بی اشتهایی، بی حالی و کم خونی نیز ممکن است اتفاق افتد.(Bovo ، ۲۰۰۷ ؛ Munday ، ۲۰۰۲) همچنین رنگ ماهیان مبتلا بر حسب نوع گونه میتواند تیره تر و یا کمرنگ تر از حد معمول گـردد. در واقـع بـی رنگی یا پررنگی نیز می تواند در گونـه هـای مختلـف ایجـاد شـود. لارو *Sea bass* آسـیایی *(Lates calcarifer)* و آتلانتیک هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*)در صورت ابتلا به VNN کم رنگ تر می شـود درحالیکـه بچـه ماهیان *Sea bass* اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) ، *Scophthalmus maximus* و هامورماهیان (.*Epinephelus* spp) پر رنگ تـر مـی شـوند کـه ایـن تـراکم رنگدانـه از ناحیـه بالـه دمـی آغـاز مـی شـود (Bellance و Gallet ، ۱۹۸۸ ؛ Glazebrook و همکـاران، ۱۹۹۰ ؛.Yoshikoshi و Inoue ، ۱۹۹۰ ؛ Bloch و همکـاران، ۱۹۹۱ ؛ Breuil و همکـاران، ۱۹۹۱ ؛ Mori ، ۱۹۹۱ ؛ Boonyaratpalin و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Grotmol و همکاران ، b ۱۹۹۷ ؛ Munday و همکاران، ۲۰۰۲).

مرحله ای از زندگی ماهی که در آن ابتلا به بیماری با بروز علایم و مرگ و میر رخ می دهـد بـا توجـه بـه گونـه ماهی و منشاء عفونـت تفـاوت دارد(Munday و همکـاران، ۱۹۹۷). اگرچـه بیشـترین تلفـات در مرحلـه لاروی و نوزادی رخ می دهد (Munday و Nakai ، ۱۹۹۷). همچنین تلفات شدید در ماهیان بالغ گونه های مختلف مانند (*Pseudocaranx dentex*) گـزارش شـده اسـت. (Arimoto و همکـاران، ۱۹۹۳ ؛ Mushiake و همکـاران، ۱۹۹۴ ؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۷)، نوعی هـامور(*Epinephelus septemfasciatus*)(Fukuda و همکـاران، ۱۹۹۶ ؛ Tanaka و همکـاران، ۱۹۹۸)، *Sea bass* اروپـایی *(Dicentrarchus labrax)*)(Bovo و همکـاران، ۱۹۹۶ ؛ Le Breton و همکاران، ۱۹۹۷).

در ابتـدا معتقـد بودنـد کـه بیمـاری فقـط در درجـه حـرارت بـالا ($30-29^{o}C$) و در فصـل تابسـتان در منـاطق گرمسیری رخ می دهد به همین دلیل آنرا بیماری تابستانه نامیدند(Bellance و Gallet ، ۱۹۹۸). اما مشاهدات بعدی نشان داد که بیماری در شرایط طبیعی می تواند در محدوده حرارتی وسیع تری رخ دهد. تلفات در بیشـتر ماهیـان گرمابی مثل نوعی هامور(*Epinephelus malabaricus*) در درجه حرارت $30-28^{o}C$ اتفاق می افتد(Danayadol و همکاران، ۱۹۹۵) یا در لارو *Sea bass* اروپایی *(Pseudocaranx dentex)*) در درجه حـرارت $26-20^{o}C$ رخ مـی دهد(Arimoto و همکاران، ۱۹۹۴).Fukuda و همکاران(۱۹۹۶) افزایش درجه حرارت را یـک عامـل زمینـه سـاز بیماری معرفی کردند ولی بیماری علاوه بر ماهیان گرمابی مـی توانـد در ماهیـان آب هـای سـرد مثـل آتلانتیـک هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*) (Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵) و *Verasper moseri* نیز ایجاد گردد که با تزریق داخل عضلانی هموژن بـافتی مغـز و چشـم ماهیـان آلـوده هامورماهیـان شـامل Seavenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) و هامورخال قرمز Epinephelus akaara بیماریزایی تجربی در آنها انجـام شد و علایم بالینی و تلفات مشاهده گردید. بیشترین تلفات و کوتاهترین دوره کمون بیمـاری در درجـه حـرارت بالای $28^{o}C$ رخ داد.

۲-٤-۱- علایم کالبدگشایی

در بازبینی اندامهای داخلی مهمترین علامتی که جلب نظر میکند اتساع شدید کیسه شنا ناشی از تجمع گاز است. اتساع کیسه شنا مکررا از گونه های مختلف از جمله *Dicentrarchus labrax* ، *Lates calcarifer* و *Pseudocaranx dentex* گزارش شده است(Breuil و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Munday و همکاران، ۲۰۰۲). در برخی مواقع یک منطقه بدون رنگدانه در پوست جمجمه و سرپوش آبششی بهمراه ضایعات قرمزی فک ها دیده می شودکه می تواند ناشی ازآسیب های فیزیکی باشد (Bovo و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Sweetmann و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Le Breton و همکاران، ۱۹۹۷). در بررسی دستگاه گوارش ماهیان بیمارخالی بودن روده و پر بودن کیسه صفرا نشان دهنده عدم تغذیه ماهیان بیمار است.(Chi وهمکاران ۱۹۹۷، Bovo وهمکاران ۱۹۹۹، OIE ۲۰۰۰).

۳-٤-۱- تغییرات بافت شناسی

در بررسی های آسیب شناسی مقاطع بافتی ماهیان بیمار مهمترین علامت گزارش شده ، پیدایش واکوئول های متعدد همراه با نکروز سلولهای عصبی است. ضایعات می تواند در قسمت های مختلف مغز، نخاع و شبکیه چشم باشند(Munday و همکاران، ۱۹۹۲ ؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵ ؛ Comps و Raymond ، ۱۹۹۶ ؛ Grove و همکاران، ۲۰۰۳).

در بررسی آسیب شناسی از بافتهای عصبی مانند مغز ضایعات واکوئولی در سیتوپلاسم سلولهای موجود در ماده خاکستری مغز خصوصا بخش خلفی بینایی[1] و با حدت کمتر در بصل النخاع، مغز جلویی[2] و نخاع مشاهده میشود. همچنین این گونه از ضایعات در لایه های هسته دار شبکیه نیز مشاهده میگردد.

بروز این ضایعات واکوئولی در سلولهای عصبی مغز و چشم (با حداکثر قطر ۵ میکرومتر) به علت تجمعات ذرات ویروسی بدون غشا در سیتوپلاسم این سلولها است که به وضوح با میکروسکوپ الکترونی قابل رویت است. در این مقاطع ذرات ویروس مدور با سطحی ناصاف و با قطری در حدود ۳۰ – ۲۵ نانومتر مشاهده میشود. در بررسی لامهای بدست آمده از بافتهای عصبی ماهیان بیمار نکروز وسیع سلولهای عصبی در نخاع، گانگلیونهای نخاعی، مغز و شبکیه مشاهده میشود. این علایم در واقع اولین علایم بیماری است که در طیف وسیعی از ماهیان دریایی پرورشی عنوان شده است(Nakai و Munday ۱۹۹۷، Bovo و همکاران ۱۹۹۹، Thiery و همکاران ۱۹۹۹، OIE ۲۰۰۰).

Grotml و همکاران(۱۹۹۷) ضایعات آندوکاردیت را در عفونت طبیعی بیماری در آتلانتیک هالیبوت مشخص کرد و نتیجه گیری نمود که ویرمی می تواند حداقل در آتلانتیک هالیبوت بعنوان یک عامل مهم مطرح باشد. در این موارد واکوئوله شدن عمدتا در لوب بینایی مغز دیده می شود.

---

[1] - Optic tectum
[2] - Telencephalon

تعداد و اندازه واکوئول ها به گونه مبتلا و بویژه سن درگیری بستگی دارد. ضایعات شدید معمولا در مراحل لاروی و نوزادی در نواحی گسترده ای ازسیستم اعصاب مرکزی (CNS) اتفاق می افتد(Glazebrook و همکاران، ۱۹۹۰ ؛ Breuil و همکاران، ۱۹۹۱). همچنین ضایعات واضحی در عقده های عصبی ستون فقرات دیده شده است(Yoshikoshi و Inoue ، ۱۹۹۰). در *Sea bass* بالغ علایم بالینی و بافت شناسی واضح بسیار کمتر از لاروها و نوزادان است و در بالغین عمدتا درگیری شبکیه چشم دیده می شود(Galeotti و همکاران، ۱۹۹۹).

۵-۱- روشهای آزمایشگاهی شناسایی ویروس

طی سالهای اخیر روشهای متعدد آزمایشگاهی جهت شناسایی و تایید تشخیص ویروس مورد استفاده قرار گرفته است. از مهمترین این روشها می توان به جداسازی ویروس و شناسایی آن بر روی کشت سلول اشاره نمود. اصولا تیره های سلولی ماهی اندکی وجود دارند که به این ویروس حساس می باشند. لیکن اولین موفقیت جهت کشت سلولی ویروس بر روی تیره سلولی SSN-1 بدست آمد(Frerichs و همکاران ۱۹۹۶، Iwamoto و همکاران ۱۹۹۹ و ۲۰۰۰، OIE ۲۰۰۰). همچنین Chi و همکاران(۱۹۹۹) گزارش نمودند که تیره سلولی GF-1 نیز به ویروس نکروز عصبی گروپر(GNNV) حساس است و از آن برای جداسازی و شناسایی ویروس مورد نظر می توان استفاده نمود.

به جز این روش، متدهای دیگر مانند هیستوپاتولوژی(Yoshikoshi و Inaue ۱۹۹۰، OIE ۲۰۰۰)، میکروسکوپ الکترونی با رنگ آمیزی مثبت و منفی (Munday و Nakai ۱۹۹۷، Mori و همکاران ۱۹۹۲، OIE ۲۰۰۰)، ایمونوهیستوشیمی (OIE۲۰۰۰) ، پادتن های درخشان مستقیم و غیر مستقیم(Nguyen و همکاران ۱۹۹۶، OIE ۲۰۰۰)، پادتن های لیبل شده با آنزیم(OIE ۱۹۹۷)، الیزا (Arimoto و همکاران ۱۹۹۲، OIE ۲۰۰۰) و روشهای مختلف مانند RT – PCR ، Nested – PCR ، Real – time PCR و نیز سکانس DNA کلون شده استفاده می شود(Bovo و همکاران ۱۹۹۹، Thiery و همکاران ۱۹۹۹، Skliris و همکاران ۲۰۰۱، Oh و همکاران ۲۰۰۲، Maeno و همکاران ۲۰۰۴، Valle و همکاران ۲۰۰۵).

بر اساس آخرین دستورالعمل های سازمان جهانی بیماری های واگیر دام (OIE) ،در کشورهائی که تاکنون بیماری بصورت رسمی گزارش نشده است تمامی سعی و تلاش محققین و مسئولین بهداشتی بایستی بر شناسائی و جداسازی ویروس عامل بیماری از طریق کشت سلولی ویروس بر روی تیره سلولی مناسب یاشد و سپس جهت تایید تشخیص عامل بیماری بایستی از روش های سرولوژیک مناسب همچون NT ، FAT و ELISA استفاده نمود و در نهایت بیماریزائی عامل جدا شده بر اساس روش Koch Postulate بر روی ماهیان حساس به بیماری آزمایش شود(OIE ، ۲۰۰۶).

بیماریزایی

در دهه ۹۰ اطلاعات چندانی در مورد چگونگی فرآیند بیماریزایی این ویروس در دسترس نبود تا اینکه Guo و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که ویروس نکروز عصبی جدا شده از ماهی گروپر چرب[1] (GGNNV) قادر به ایجاد القا آپوپتوزیس در تیره سلولی باس دریایی(*Sea bass*) است.

وی نشان داد در سلولهای آلوده به ویروس فعالیت پروتئازهای شبه کازپاز ۸ و ۳ که از مهمترین پروتئازهای القا کننده مرگ برنامه ریزی شده سلول است به شدت افزایش می یابد. در مقابل با مصرف عوامل مهار کننده فعالیت پروتئازهای شبه کازپاز۸ و ۳ میزان آپوپتوزیس را کاهش داد. آنچه که موجب القا مسیر خارجی آپوپتوزیس در این سلولها شده است پروتئین α تولید شده توسط این ویروس است. این پروتئین با وزن مولکولی ۳۷ kDa توسط قطعه RNA_2 کد میشود. این پروتئین پیش ساز پروتئینهای کپسید ویروس است و نقش مهمی در مونتاژ شدن ویروس دارد. اصولا فرایند آپوپتوزیس از آنجایی که با ایجاد مرگ سلول هیچگونه فرایند التهابی را فعال نمی کند لذا ابزاری برای بیماریزایی و نیز فرار ویروس از دسترس سیستم ایمنی است(Guo و همکاران ۲۰۰۳).

بیماریزایی در پستانداران و انسان

خانواده نوداویریده[2] به دو جنس آلفا و بتانوداویروس تقسیم میشوند. آلفانوداویروس ها غالبا عامل ایجاد عفونت در حشرات بوده و بتا نوداویروس ها در ماهیان بیماریزا هستند. جنس آلفا نودا ویروس هشت گونه دارد که از آنها تنها گونه نوداموراویروس(NoV)[3] برای حشرات و پستاندران بیماریزا میباشند. این ویروس بصورت تجربی موجب عفونت در بچه موشها و بچه هامسترهای شیرخوار شده و باعث فلجی شل در اندام حرکتی خلفی و در نهایت موجب مرگ میگردد. گذشته از این نشان داده شده است که در سرم خوکها آنتی بادی خنثی کننده ویروس NoV وجود دارد که نشان میدهد خوک به عفونت طبیعی با این ویروس حساس است (Banu و Nakai، ۲۰۰۴).

در بررسی که Banu و Nakai (۲۰۰۴) انجام دادند قابلیت بیماریزایی دو ویروس SJNNV و RGNNVرا در موشهای BALB/c ماده ای که ۴ هفته بودند آزمایش کردند. در این بررسی دو آزمایش انجام شد در مرحله اول بعد از تزریق $10^{7/5}$ $TCID_{50}$ بصورت داخل عضلانی و داخل صفاقی موشها تا ۱۴ روز نگهداری شدند وطی ۱۴ روز هیچگونه علایم بالینی در موشها مشاهده نشد. در آزمایش دیگر با همان دوز ویروس موشها ۳، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق کالبدشکافی شده و ردیابی ویروس در اندامهای داخلی آنها انجام شد. در این بررسی طی ۳ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، ویروس در کلیه موشها قابل ردیابی بود. لیکن پس از ۷۲ ساعت ویروس ناپدید

---

1 -Greasy groper (*Epinephelus tauvina*)
2 - Nodaviridae
3 - Nodamora virus

گردید. طی هر دوآزمایش ویروس از اندامهای اصلی که بتا نوداویروس به آنها حمله میکند مانند مغز، نخاع و چشم جدا نگردید. این نتایج نشان داد که موش میزبان حساس به بتانوداویروس نمی باشد(Banu و Nakai، ۲۰۰۴). در یک بررسی جدید توسط محققین ژاپنی، امکان عفونت زائی بتانودا ویروس (ژنوتایپ RGNNV) درتیره های سلولی انسانی (HeLa, 293T, and A549) به روش in vitro مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ژنوتایپ قادر به اتصال به سلول های انسانی می باشد. اگرچه نفوذ بتا نوداویروس ها به داخل این سلول ها قابل شناسائی نبود با این وجود زمانی که با RNAs بتانوداویروس ها انتقال می یافتند، سلول های انسانی از تکثیر بتانوداویروس ها حمایت می کردند. یافته های این محققین حاکی از آن است که سلول های انسانی فاقد گیرنده های اختصاصی میزبانی برای عفونت های بتانوداویروس ها می باشند. بنابراین بتانوداویروس در شرایط فعلی احتمالا به خاطر فقدان گیرنده های مورد نیاز ودرجه حرارت نامناسب برایRNA وابسته به آنزیم RNA polymerase قادر به ایجاد عفونت در۳۷ درجه سانتیگراد در انسان نمی باشد (Adachi و همکاران، ۲۰۰۸).

پیشگیری، کنترل و درمان

از آنجایی که بیماری نکروز عصبی یک بیماری ویروسی است تاکنون هیچ راه درمانی مشخصی برای آن ارائه نشده است. لیکن تلاشهایی در جهت معرفی بعضی از ترکیبات شیمیایی در این زمینه

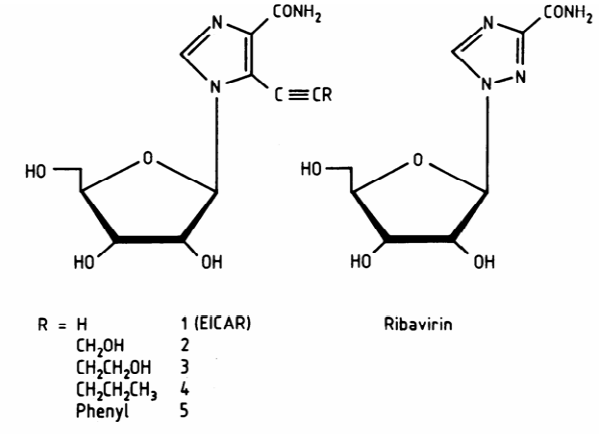
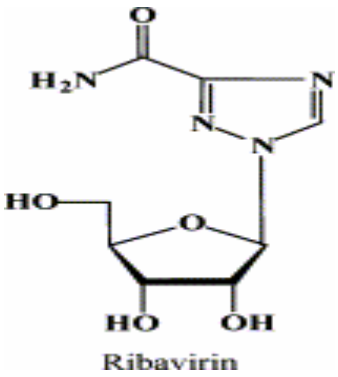


FIG. 1. Formulas of 5-alkynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamides and ribavirin.



انجام شده است. از این موارد میتوان به ریباورین[1] و آنالوگ آن به نام ایکار[2] اشاره نمود.

[1] - Ribavirin
[2] - Eicar

فعالیت این عوامل دارویی در چند مسیر است :

۱ – ممانعت از عملکرد آنزیم IMP دهیدروژناز

۲ – تصحیح عملکرد سلولهای T کمکی[1]

۳ – ممانعت یا ایجاد اختلال در عملکرد و فعالیت آنزیم RNA پلی مراز ویروسی در ویروس های: (Influenza virus, Reovirus, HCV, HIV-1)

۴ – ایجاد موتاسیونهای مرگ آور در ساختار ژنتیکی ویروس در(Poliovirus)

این دو ترکیب آنتی ویرال در محیط های (IN VITRO) با نتایج خوبی به همراه بوده است ولی تعیین اثرات آنها در محیط های (IN VIVO) هنوز در حال مطالعه و بررسی است.

لیکن از آنجایی که استفاده از عوامل دارویی نمیتواند اثر بخشی مناسبی در جهت کنترل تلفات داشته باشد بیشتر تلاشها در جهت ایجاد ایمنی زایی و پیشگیری از بروز بیماری انجام شده است.

یکی از مهمترین تلاشها در جهت ممانعت از بروز بیماری استفاده از مولدین و لاروهای غیر آلوده به این ویروس است که امری میسر میباشد. همچنین ضد عفونی نمودن لارو ماهیان با مقادیر اندک ازن و ترکیبات ید دار و ضد عفونی نمودن وسایل موجود در هچری با هیپوکلریت سدیم، بنزآلکونیوم کلراید یا ترکیبات ید دار برای کنترل ویروس بیماری موثر است. امروزه استفاده از ازن یکی از ابزارهای مهم جهت ضدعفونی تخم ماهیان مختلف حساس به ویروس نکروز عصبی است (Hegde و همکاران ۲۰۰۵). باید توجه داشت که نوداویروس بسیار مقاوم در برابر شرایط محیطی است لیکن نشان داده شده که ازن قادر به غیر فعال نمودن ویروس میباشد هرچند که دوز اختصاصی برای آن گزارش نشده است(Frerichs و همکاران ۲۰۰۰، Grotmol و Totland ۲۰۰۰).

البته تخمهای لقاح یافته گونه های مختلف مقاومت متفاوتی در برابر ازن دارند و به همین جهت برای هر گونه باید دوز مصرفی تعیین شود زیرا تخمهایی که در معرض دوز بالای ازن قرار میگیرند طی دوره انکوباسیون زنده می مانند ولی قابلیت تفریخ نداشته و بعد از مدت ۴– ۳ روز می میرند (Arimoto و همکاران ۱۹۹۶، Mimura و همکاران ۱۹۹۹ ، Grotmol و Totland ، ۲۰۰۰).

Grotmol و Totland (۲۰۰۰) نشان دادند که این مسئله میتواند مربوط به تغییر پلیمر پروتئین دیواره تخم در مواجهه با ازن باشد میشود به اضافه اینکه ترشح آنزیمهای دخیل در تفریخ نیز کاهش یافته و یا از اثر گذاری کمتری برخوردار میگردند.

بطور اختصار اهم موارد پیشگیری بهداشتی[2] به شرح ذیل می باشد:

۱. پایش مستمر وضعیت بهداشتی مولدین با توجه به اینکه انتقال عمودی از مولدین به تخم ها به اثبات رسیده است.

---

[1] - T helper cell

[2] - Sanitary Prophylaxis

۲. شناسائی و جمع آوری مولدین حامل عامل بیماری[۱]

۳. کاهش استرس در زمان تخم کشی از مولدین که شانس عفونت تخمدانی را در ماهیان حامل کاهش خواهد داد.

۴. پرهیز از هرگونه استرس در قفس های آلوده و برداشت روزانه موارد تلفات ومعدوم نمودن آنها به روش بهداشتی

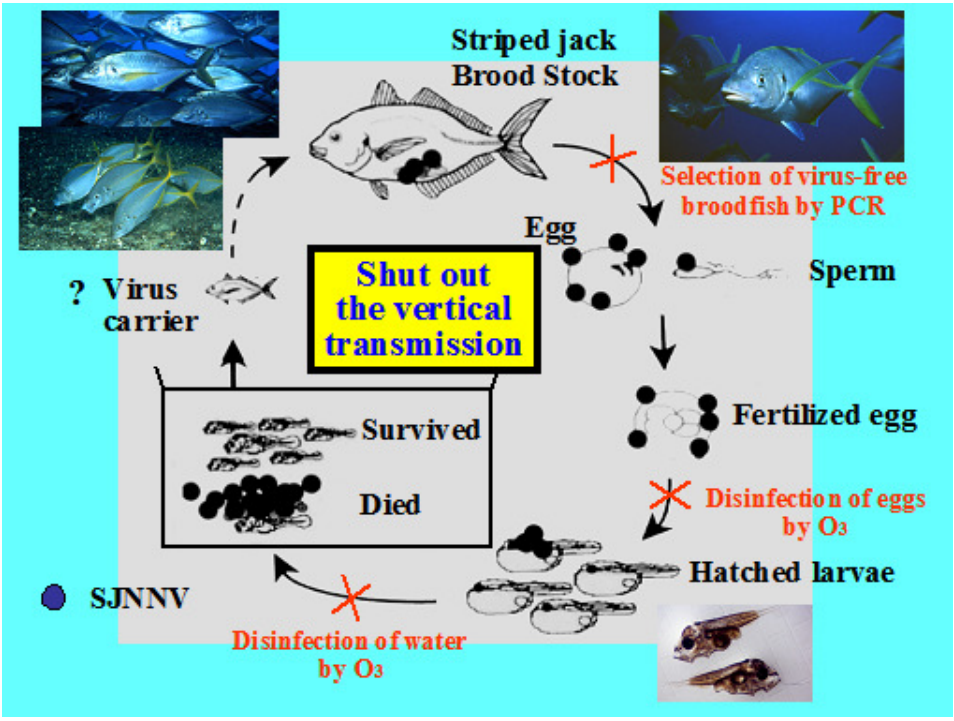
۵. ضدعفونی نمودن آب هچری ها با استفاده از UV و Ozone

۶. عدم استفاده از سیستم های برگشت آب در هچری های فشرده و متمرکز.

۷. ضدعفونی شیمیائی تخم ها، آب در حال استفاده و تانک های محتوی لاروها.

۸. کاهش تراکم لاروها از میزان ۱۵-۳۰ لارو در هر لیتر به میزان کمتر از ۱۵ لارو در هر لیتر(به میزان کمتر از ۱۰ لارو در هر لیتر ارجح داده می شود).

۹. از برگرداندن تلفات و ماهیان در حال احتضار[۲] به دریا اکیدا خودداری شود.



تصویر شماره ۸: مراحل مختلف قطع زنجیره انتقال بیماری از مولدین تا لارو های جدید (Chi و همکاران، ۲۰۰۶)

[۱] - Carrier
[۲] - Moribund fish

با توجه به مشکلاتی که در مسیر پیشگیری از بروز بیماری با مواد ضد عفونی کننده وجود دارد، روش دیگری که محققین در پی آن هستند تا تلفات ناشی از این ویروس را خصوصا در لارو و بچه ماهیان کاهش دهند واکسیناسیون است. تلاش در جهت ایجاد یک واکسن از دهه ۹۰ آغاز شد.

Nakai و همکاران (۱۹۹۵) اولین کسانی بودند که ایمن زایی جک راه راه با استفاده از پروتئین نو ترکیب ویروس نکروز عصبی جک راه راه (SJNNV) را انجام دادند و تولید پادتن خنثی کننده ویروس را در این ماهی نشان دادند. تاکنون در دنیا چندین گروه تحقیقاتی در مورد تولید واکسن و چگونگی ایمن سازی فعالیت داشته اند تا بتوانند یک برنامه ایمن سازی مناسب در برابر این بیماری ایجاد نمایند.

از این موارد میتوان به مطالعات Husgaro و همکاران (۲۰۰۱) اشاره نمود. آنها افزایش مشخص دوز پادتن اختصاصی در پی ایمن سازی ماهیان توربوت بالغ با امولسیون روغنی پروتئین نوترکیب کپسول را نشان دادند.

در تجربه دیگری Hegde و همکاران (۲۰۰۲) توانستند طی دو مرحله تزریق ویروس خالص و پروتئین کپسید ویروس به خرگوش آنتی سرم پلی والانی را بدست آوردند که قابلیت خنثی سازی ویروس در شرایط in vitro را داشت.

در تمام مطالعات فوق علی رغم نتایج مناسب بدست آمده هیچیک واکسن تجاری مناسبی را ارائه ندادند. از طرفی اثرگذاری این واکسنها در ماهیان دریایی تنها از طریق تزریق بررسی شده بود در حالیکه این بیماری ویروسی در مراحل اولیه زندگی ماهیان تلفات شدید ایجاد می کند که تجویز تزریقی واکسن امکان پذیر نیست(Hegde و همکاران ۲۰۰۵).

در بررسی که Hegde و همکاران (۲۰۰۵) انجام دادند ایمنی زایی واکسن پروتئین نوترکیب کپسول ویروس را در دو ماهی گوپی و گورامی بصورت غوطه وری و تزریق بررسی کردند و پاسخ آن را با ویروس کشته شده با فرمالین ماهی گروپر(ETNNV)[1] مقایسه کردند. خنثی سازی ETNNV و ویروس نکروز عصبی گوپی(GNVV)[2] در in vitro با اندازه گیری پاسخ آنتی بادی خنثی کننده انجام شد. خنثی سازی in vitro با استفاده از عصاره کامل بدن[3] ماهیان گوپی ایمن شده با غوطه وری و آنتی سرم بدست آمده از ماهیان گورامی ایمن شده با تزریق نشان داد که ویروس ETNNV کشته شده با فرمالین و پروتئین نوترکیب کپسول آن موجب خنثی سازی پادتن میشود. بعلاوه آنتی سرم پلی کلونال خرگوش در برابر پروتئین نوترکیب کپسول ویروس ETNNV نیز افزایش می یابد. با توجه به نتایج فوق اهمیت پروتئین نوترکیب کپسول ویروس به عنوان واکسن پیشنهادی پیشگیری از بیماری و مناسب بودن آن برای ایجاد ایمنی از طریق غوطه وری مشخص گردید.

---

1 - *Epinephelus tauvina* nervous necrosis virus
2 - guppy nervous necrosis virus
3 - whole – body extract

در گام بعدی محققین از ذرات شبه ویروسی(VLP_s)[1] جهت ایجاد مقاومت در ماهیان استفاده نمودند. ماده ژنتیکی ویروس از یک رشته Positive sences RNA دو قسمتی تشکیل شده است که RNA_1 مسئول تولید ماده ژنتیکی ویروس و RNA_2 مسئول کد نمودن مولکول پروتئینی کپسید ویروس است. اساس تولید VLP_s با انتقال RNA_2 از ویروس به یک باکتری مانند اشریشیا کولی و یا یک ویروس نظیر باکلوویروس می باشد(Lu و همکاران۲۰۰۳).

Thiery و همکاران (۲۰۰۶) قابلیت ایمنی زایی VLP_s ویروس نکروز عصبی تولید شده از باکلوویروس را در باس دریایی اروپایی مورد بررسی قرار دادند. آزمایشات الیزا و خنثی سازی سرم تایید کرد که سرم ماهیانی که با تزریق داخل عضلانی با دوزی در حد ۰/۱ µg از VLP_s واکسینه شده اند، VLP_s قابلیت القا سنتز پادتن ضد بتانوداویروس را دارد. گذشته از این ماهیان واکسینه شده در مواجهه با ویروس زنده مقاومت نشان داده و زنده ماندند. پاسخ ایمنی و اثرات محافظتی در مواجهه با ویروس در این بررسی کاملا وابسته به دوز بود. اطلاعات بدست آمده از RT – PCR[2] نشان داد که دوزهای بالاتر واکسن موجب کاهش تعداد ماهیان واجد مقادیر قابل ردیابی از RNA بتانوداویروس طی ۳۰ روز پس از مواجهه شد. بر اساس این اطلاعات مشخص میشود که VLP_s بدست آمده از باکلوویروس می تواند به عنوان یک واکسن موثر در برابر ویروس نکروز عصبی معرفی گردد.

Liu و همکاران (۲۰۰۶) نیز قابلیت ایمنی زایی VLP_s مربوط به GNNV را در ماهی گروپر مورد بررسی قرار دادند. ماهیان با تزریق و با دوزهای مختلف VLP_s واکسینه شدند. بررسیها نشان داد که تیتر پادتن در ماهیان واکسینه بطور قابل ملاحظه ای طی ۴ هفته افزایش یافت بطوریکه در این مدت پادتن بطور مشخصی قابلیت خنثی سازی ویروس را داشت. با یک تزریق ۲۵۰ – ۱۰ µg از VLP_s تیتر پادتن افزایش یافته و تا یک ماه تیتر پادتن ثابت باقی ماند. البته در بین دوزهای مصرفی تیتر بدست آمده از تزریق ۲۵۰ µg و ۱۰۰ از VLP_s ۱۳٪ بیشتر از دوز ۱۰ µg بود. دو تزریق ۱۰۰ µg و ۱۰ از VLP_s بیشترین تیتر پادتن را ایجاد کرد که ۲۹٪ بیشتر از شرایط تک تزریقی بود در حالیکه دو تزریق ۲۵۰ µg و چهار تزریق ۱۰۰ µg یطور چشمگیری موجب کاهش تیتر پادتن به ترتیب ۲۳٪- و ۴۴٪- می شود. این نتایج نشان میدهد اثرات ناشی از دوز بالا[3] در دوزهای بیشتر از ۲۰۰ µg اتفاق می افتد نتایج نشان داد که این واکسن جهت افزایش تیتر پادتن نیاز به ادجوآنت ندارد.

با این بررسی مشخص گردید که ایمن سازی با VLP_s میتواند موجب تولید تیتر بالای پادتن به مدت ۵ ماه گردد که این مسئله مرتبط با ایمن سازی طولانی مدت است و هنگامی که این واکسن در دوز ۱ µg/g وزن ماهی استفاده شود میتواند ایمنی کافی را در ماهی ایجاد کند.

---

[1] - Virus – like Particles
[2] - Revers transcription - PCR
[3] - Overdose effects

در مطالعه دیگری Lin و همکاران استفاده از VLP_s را به عنوان واکسن خوراکی در لارو ماهی گروپر مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه آرتمیا کپسول دار غنی شده با باکتری اشریشیا کولی تلقیح شده با ژن کپسید پروتئینی ویروس نکروز عصبی به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گرفت و از آن برای واکسیناسیون لاروها استفاده گردید. آزمایشات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که آنتی ژنها در دستگاه گوارش لاروها به دام افتاده و واکسن فوق موجب القا تولید پادتن اختصاصی ضد ویروس ۷ روز پس از واکسیناسیون شده است بطوریکه این پادتن با الیزا قابل اندازه گیری بود. لاروهای واکسینه شده درجه معینی از مقاومت را بعد از مواجهه با ویروس نشان دادند و در صد بقایی در حدود ۲/ ۶۴٪ و ۶۹/۵٪ داشتند. با توجه به نتایج فوق مشخص میشود که واکسن خوراکی فوق میتواند بطور موثری موجب ایمنی لاروها می گردد و این روش میتواند در تمام ماهیان حساس به این ویروس در مرحله لاروی مورد استفاده قرار گیرد.

٦-١-پیشینه تحقیق و تاریخچه بروز بیماری و مروری بر کارهای گذشته در ایران

- اولین بار بروز علایمی چون اتساع محوطه بطنی و شنای غیر طبیعی در کفال ماهیان صید شده در فاصله زمانی اسفند ۷۷ تا تیر ۱۳۷۷ در پره های صیادی استانهای گیلان توسط صیادان و کارشناسان تحقیقات شیلات مشاهده و گزارش گردید
- سلطانی و رهاننده (۱۳۸۰)، بر اساس علایم بالینی، عوارض مشاهده شده را تحت عنوان عارضه نفخ گزارش کردند.در این بررسی بررسیهای بالینی،کالبدگشایی و میکروبیولوژی به عمل آمده بر روی تعداد ۵۰ قطعه ماهی کفال گونه پوزه باریک صید استان گیلان نشان داد که تعداد ۴۰ قطعه (۸۰ درصد) ماهیان مذکور مبتلا به عارضه نفخ ناشی از سوء تغذیه بوده اند.
- گزارش دیگری از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مبنی بر مشاهده تلفاتی در حدود ۴۰ قطعه از کفال ماهیان در حوضچه اسکله یگان ویژه نیروهای انتظامی خزر شهر به موسسه تحقیقات شیلات ایران اعلام گردید. در بررسی ۳۱ مورد از تلفات ماهیان کفال طلائی با وزن کمتر از ۷۰ گرم در تاریخ ۱۳۸۰/۱۱/۲۴ در منطقه مزبور، به جز رگه های خونریزی در قسمت قدام تنه نزدیک به برانش، هیچگونه علائم غیر طبیعی دیگری اعم از زخم، پارگی محوطه بطنی یا جمع شدن مایعات در شکم ماهیان مشاهده نگردید (گزارش ارسالی از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۲ اسفند ۱۳۸۰).
- پس از آن علایم فوق در اواخر پاییز ۱۳۸۱ در کفال ماهیان سواحل مرکزی استان مازندران (بابلسر و فریدونکنار) در تعداد اندکی از ماهیان صید شده مشاهده گردید(گزارش ارسالی از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به معاونت صید و صیادی شیلات ایران ۱۳۸۱).

- در پی وقوع مجدد تلفات در سال ۱۳۸۲ در منطقه زیباکنار استان گیلان، گزارش محرمانه ای از بخش مدیریت ذخائرپژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی (بندر انزلی) مبنی بر مشاهده نمونه هائی از کفال ماهیان با تورم شکمی در سه شرکت تعاونی پره منطقه جفرود تا زیبا کنار به بخش بهداشت و بیماری های موسسه تحقیقات شیلات ایران واصل گردید.بر اساس این گزارش بررسی های انجام شده بر روی صید سه شرکت تعاونی پره در منطقه یاد شده در تاریخ ۸۲/۱۰/۲۸ عمده صید این شرکت ها که به ترتیب در حدود ۱۵، ۳۰ و ۱۳۰ کیلوگرم بوده، را ماهی کفال تشکیل داده و بیش از ۹۵٪ آنها دچار تورم شکمی بودند. متعاقب این گزارش تیم تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران شامل نگارنده و دکتر شریف پور به منطقه اعزام شده ومطالعات و نمونه برداری های اولیه انجام شد و گزارش تخصصی آن در اردیبهشت سال ۱۳۸۳ شامل اقدامات انجام شده ، نمونه برداری های صورت گرفته، علایم بالینی و کالبد گشایی و انجام آزمایشات مربوطه توسط مجری مسئول طرح ملی (نگارنده) تهیه و تدوین و ارائه گردید(گزارش تخصصی در ضمائم پیوست قابل دسترس می باشد).
- بررسیهای اولیه در مورد علل احتمالی این بیماری در قالب یک طرح آزمایشی(Case Study) در همان سال صورت گرفت و پس از انجام نمونه برداری های متعدد از ماهیان مبتلا و آزمایشهای تشخیصی اولیه همچون آسیب شناسی و باکتری شناسی و نیز رایزنی با اساتید متخصص خارجی، نمونه های مغز ماهیان واجد علایم بالینی به آزمایشگاه رفرانس OIE در کشور ژاپن برای (Prof.Nakai) و نیز دانشگاه ملی تایوان برای (Prof.Chi) ارسال گردید.
- در هر دو آزمایشگاه، آزمایش های مولکولی RT – PCR و Nested PCR بر روی نمونه های ارسالی با هدف شناسایی Piscine nodavirus که عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی میباشد صورت گرفت. نتیجه حاصل از آزمایشات نشان از وجود ویروس در نمونه های مغز داشت{مکاتبات شخصی مجری مسئول (نگارنده) با Prof.Nakai و Prof.Chi)}
- محصول حاصل از Nested PCR تحت آنالیز سکانس قرار گرفت که نتیجه آن وجود رابطه ای نزدیک میان ویروس احتمالی و سایر نوداویروسهای گزارش شده عامل بیماری نکروز عصبی بود.همچنین آنالیز سکانس آمپلیکون RT–PCR ، مشابهت ژنتیکی میان ویروس احتمالی و سویه RGNNV را تا حدود ۹۰٪ نشان داد {مکاتبات شخصی مجری مسئول (نگارنده) با اساتید یاد شده}.
- از نمونه های مغز ارسال شده به مرکز رفرانس (OIE) در ژاپن، هموژن فیلتر شده از مغز و چشم کفال ماهیان مبتلا تهیه و به اتاقک خلفی چشم ماهی گروپر هفت خط[1] که یکی از ماهیان بسیار حساس به سویه های این ویروس است، به روش داخل چشمی[2] تزریق وتلفات شدید(درحدود ۱۰۰٪) ایجاد گردید که براساس

[1] - *Sevenband grouper*
[2] - Intravitreous

پروتکل های آزمایش اثبات بیماریزائی، این عمل سه بار تکرار شد و در هر سه مرحله تلفات ۱۰۰٪ مشاهده گردید. در آزمایش های مولکولی که بر روی نمونه های مغز ماهیان تلف شده انجام شد، وجود ویروس احتمالی مثبت اعلام گردید {(مکاتبات شخصی مجری مسئول(نگارنده) با اساتید یاد شده}.

- ذریه زهرا و همکاران(۲۰۰۵)، عامل نوداویروس را از نمونه های فوق الذکر با روش تشخیصی RT-PCR Nested ردیابی و بصورت یک مقاله علمی در مجله علمی انگلیسی موسسه تحقیقات شیلات ایران (Iranian Journal of Fisheries Science)گزارش کردند. در این بررسی هیچگونه عامل باکتریایی بیماریزا مشاهده نشد و فاکتورهای محیطی و اکولوژیکی مکان وقوع تلفات، طبیعی بود.
- ذریه زهرا و همکاران انستیتو بین المللی تحقیقات ماهیان خاویاری دریک بررسی در اسفند ۱۳۸۳ بر مبنای گشت دریایی انجام شده توسط بخش ارزیابی ذخائر انستیتو در زمستان ۸۳ که ۳۲ ایستگاه دریائی را در استان گیلان تحت پوشش داشته است ۷۳ عدد ماهی خاویاری بصورت تصادفی صید شدکه در مجموع ۳۵ نمونه از مغز و چشم این ماهیان بر اساس پروتکل مربوطه مورد فراوری قرار گرفته و سوپرناتانت حاصله به آزمایشگاه های رفرانس ذکر شده ارسال گردیدندکه درآزمایشات مولکولی با روش Nested RT-PCR انجام شده۲۰ ٪ از نمونه های فوق از نظر وجود ویروس احتمالی مثبت اعلام گردیدند {مکاتبات شخصی مجری مسئول (نگارنده) با Prof.Nakai و Prof.Chi)}.
- طی بررسی انجام شده توسط پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر از زمستان ۱۳۸۳ تا تابستان ۱۳۸۴ که نمونه برداری با روش ترال و توسط شناور تحقیقاتی گیلان از ۴۹ ایستگاه نمونه برداری در سراسر سواحل جنوبی دریای خزر انجام شد مشخص گردید که بروز علایم بالینی خاص این بیماری نوظهور در تابستان بیشتر از زمستان بوده است. نتایج حاصل از این بررسی در جدول شماره ۱ و ۲ آمده است(سعیدی و همکاران ۱۳۸۴).

جدول شماره ۱- مقایسه میزان درصد ماهیان سالم و بیمار صید شده در دو گونه از کفال ماهیان دریای خزر طی زمستان ۱۳۸۳

کفال پوزه باریک *(Liza salience)*			کفال طلائی *(Liza auratus)*		
ماهیان سالم	ماهیان مبتلا	تعداد کل	ماهیان سالم	ماهیان مبتلا	تعداد کل
۸۹۲	۱۰۰۰	۱۸۹۲	۴۴۲	۳۰۴	۷۴۶
٪ ۷/۸۳	٪ ۹۲/۱۷	درصد	٪ ۵۹/۲۵	٪ ۴۰/۷۵	درصد

هم زمان با استان مازندران در استان گیلان نیز طی گشت دریایی که در تیر ماه ۱۳۸۴ صورت گرفت در ۹۳٪ ماهیان کفال صید شده علایم بالینی مشابه مشاهده گردید (گزارش پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، شهریور ۱۳۸۴)(جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- مقایسه میزان درصد ماهیان سالم و بیمار صید شده در دو گونه از کفال ماهیان دریای خزر طی گشت دریائی تابستان ۱۳۸٤

کفال پوزه باریک *(Liza salience)*			کفال طلائی *(Liza auratus)*		
ماهیان سالم	ماهیان مبتلا	تعداد کل	ماهیان سالم	ماهیان مبتلا	تعداد کل
۱۴۰۹	۱۶۵۸۳	۱۷۹۹۲	۱۰۶۱	۱۹۶۴	۳۰۲۵
٪ ۷/۸۳	٪ ۹۲/۱۷	درصد	٪ ۳۵/۰۷	٪ ۶۴/۹۳	درصد

الف ب

تصویر شماره۹ : وضعیت ظاهری(الف) و داخلی(ب) کفال ماهیان بیمارصید شده دریای خزر طی زمستان ۱۳۸۳ تا تابستان ۱۳۸٤

- شریف پور و ذریه زهرا در سال ۱۳۸۴ در بررسی آسیب شناسی بافتهای مختلف کفال ماهیان مبتلا، حضور نکروز و واکوئول را درلایه گرانولار مغز و مخچه گزارش کردند (چهارمین کنفرانس دامپزشکان علوم بالینی، ارومیه، ۱۳۸۴).
- زاهدی و همکاران(۲۰۰۸) از برخی کفال ماهیان بیمار، باکتری ویبریو جداسازی و گزارش کردند Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Florence, Italy

از بهمن ماه ۱۳۸۲ که مجددا گزارشی از وجود چنین علایمی در ماهیان کفال صید شده در استان گیلان داده شده بررسی های دقیق تری صورت گرفت و در نهایت ردپای ویروس نکروز ویروسی عصبی تایید شد. با توجه به دستورالعمل OIE (۲۰۰۶) که شناسایی ویروس را منوط به جداسازی آن بر روی تیره های سلولی حساس و تشخیص ویروس جدا شده به کمک حداقل ۲ روش تاییدی همزمان IFAT و RT-PCR یا ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR می داند، تا زمان انجام پروژه حاضر، سابقه ای از جداسازی و تشخیص کامل بیماری در ایران وجود نداشت و با توجه به تلفات غیر متعارف کفال ماهیان دریای خزر وکاهش شدید میزان صید این ماهیان از ۶۴۴۶ تن در سال ۱۳۸۱ به حدود ۲۷۸۰ تن در سال ۱۳۸۷ (بخش بیولوژی و مدیریت ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران) بررسی دقیق و کامل بیماری ضروری به نظر می‌رسید لذا برای تایید وجود این بیماری طرح ملی تحت عنوان (مطالعه بیماری نکروز عصبی ویروسی، جداسازی، شناسایی و بیماریزایی آن در کفال ماهیان دریای خزر و بررسی بیماریزایی واحتمال انتقال آن به سایر ماهیان خاویاری، سفید و پرورشی)توسط مجری مسئول (نگارنده) طراحی و تدوین گردید و در سال ۱۳۸۵ در موسسه تحقیقات شیلات ایران به تصویب رسید و در

قالب سه زیرپروژه در سه مرکز تحقیقاتی شمال ایران شامل پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری)، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی) و انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) در سه استان شمالی کشور از مهرماه ۱۳۸۵ به مرحله اجرا درآمد.

تصویر شماره۱۰: موقعیت جغرافیائی سه استان مورد مطالعه در حوضه جنوب دریای خزر

۲-مواد و روش کار

۲-۱- مواد مصرفی

صید و انتقال ماهیان

ماهیان مبتلا، آب دریا

زیست سنجی و نمونه برداری

ساچوک ، اسانس گل میخک

آزمایش آسیب شناسی بافتی

لام و لامل، الکل اتیلیک،گزیلل، رنگ ائوزین، رنگ هماتوکسیلین و ائوزین، پارافین، لوله فالکون ۱۵ و ۵۰ سی سی، میکروتیوپ ۱/۵ سی سی، فرمالین ۱۰ درصد

آزمایش هماتولوژی وسرمی

لام ولامل، سرنگ استریل، میکروتیوب های اپندورف، هپارین، محلول ریس رقیق، لوله های میکروهماتوکریت، محلول گیمسا، کیت پارس آزمون

آزمایش باکتریولوژی

ظروف نمونه برداری، الکل ۷۰٪، محیط آگار خوندار، محیط لاکتوز براث، پلیتهای کشت، انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد،

آزمایش سنجش فلزات سنگین

ظروف نمونه برداری، بافرهای مورد نیاز

آزمایش ایمونوهیستوشیمی

لام و لامل، گزیلل ، اتانل، آب مقطر، Wax pap ، متانول، H_2O_2 ، PBS ، TBS ، آنتی بادی مونوکلونال ضد نوداویروس، آنتی بادی بزی ضد ایمونوگلوبولین موشی کنژوگه شده با بیوتین، پراکسیداز- استرپتاویدین، BSA ، محلول DAB ، هماتوکسیلین و ائوزین

کشت سلول

فلاسک کشت سلول $25\ cm^2$ و $75\ cm^2$ ، محیط کشت EMEM (ساخت شرکت سیگما) ، سرم جنین گاوی(FCS)، پنی سیلین، استرپتومایسین، آمفوتریسین B ، آب مقطردیونیزه، پیپت استریل یکبار مصرف، پلیت ۲۴ خانه، فیلتر ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرون

آزمایش پادتن های درخشان به روش غیرمستقیم (IFAT)

لام و لامل، آنتی بادی مونوکلنال ضد نوداویروس(.Aquatic diagnostics Co) ، آنتی آنتی بادی ضد نـوداویروس(.Aquatic diagnostics Co) تهیه شده در بز و کونژوگه شده با FITC (.Aquatic diagnostics Co) استن، گلیسرول و PBST.

شایان ذکر است در این پژوهش از دو آنتی بادی مختلف ضد بتانوداویروس در آزمایش پـادتن هـای درخشـان غیر مستقیم استفاده شد:

۱- آنتی بادی مونوکلونال تولید شده توسط دانشگاه استرلینگ(.Aquatic diagnostic Ltd)

۲ - آنتی بادی تهیه شده در دانشگاه تکنیکال دانمارک (آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا)

آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز (Nested-RT-PCR):

در این تحقیق از کیت استخراج RNA و کیـت PCR بنـام کیـت IQ2000 ™ سـاخت شـرکت IQ2000 (کشـور تایوان) استفاده شد، سرسمپلرهای زرد، آبـی و کریسـتالی، میکروتیـپ هـای ۰/۲ و ۱/۵ سـی سـی، ایزوپروپانـل، کلروفرم، اتانل ۹۵ درصد، ژل آگارز، بافر TAE ، اتیدیوم بروماید و دستکش یکبار مصرف

میکروسکوپ الکترونی

گلوتارآلدهید، سدیم کاکودیلات، اسمیوم تتراکساید، میکروتیوپ ۲ سی سی

مواجهه سازی

ماهیان گوپی و بچه ماهیان قره برون، سوپرناتانت سلولهای SSN-1 حاوی نوداویروس

۲-۲-مواد غیرمصرفی

صید و انتقال ماهیان

کپسول اکسیژن، وان های پلاستیکی

زیست سنجی و نمونه برداری

ونیرو ، وان های ۲۰ لیتری ، خط کش و ترازوی دیجیتالی ویژه زیست سنجی

آزمایش آسیب شناسی بافتی

هود شیمیایی، دستگاه اتوتکنیکوم، میکروتوم، بن ماری و میکروسکوپ نوری

آزمایش هماتولوژی وسرمی

سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، لام نئوبار، فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد، دستگاه اتوآنالایزر

آزمایش باکتریولوژی

انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد، هود باکتریولوژی

آزمایش سنجش فلزات سنگین

دستگاه (Freeze drier) ، دستگاه (Atomic absorbtion)

آزمایش ایمونوهیستوشیمی

دستگاه اتوتکنیکوم، میکروتوم، بن ماری، اتاقک مرطوب، انکوباتور و میکروسکوپ نوری

کشت سلول

انکوباتور یخچالدار، میکروسکوپ اینورت، فیلتر میلی پور، پیپتور، هود لامینار

آزمایش پادتن های درخشان به روش غیرمستقیم

میکروسکوپ فلورسنت، انکوباتور

آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز

ترمال سایکلر Techne مدل TC-512، Vortex ، Microcentrifuge ، سانتریفیوژ یخچالدار، الکتروفورز افقی، UV transilluminator مجهز به دوربین دیجیتال

میکروسکوپ الکترونی

میکروسکوپ الکترونی، اولترامیکروتوم

مواجهه سازی(Challenge)

آکواریوم، پمپ هوا، بخاری،پمپ آب

۳-۲- روش کار

به منظور انجام این تحقیق، متعاقب برنامه ریزی های بعمل آمده و بر اساس دستورالعمل اجرائی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی (VNN) تهیه شده توسط مجری مسئول طرح ملی (اصل دستورالعمل در ضمائم قابل دسترس می باشد) مراحل مختلف اجرایی شامل فازهای مطالعاتی، عملیات صحرایی، عملیات آزمایشگاهی، ثبت ودر نهایت تجزیه و تحلیل نتایج حاصله طراحی گردید و در سه پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری)، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی) و انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) طی مدت سه سال اجراگردید.

آزمونهای انتخابی مورد استفاده در این تحقیق جهت تشخیص ویروس VNN به ترتیب عبارت بودند از: هیستوپاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی، پادتن های درخشان به روش غیرمستقیم (IFAT) ، واکنش زنجیره ای پلیمراز (Nested RT- PCR) و به صورت همزمان تلقیح هموژن بافت مغز و چشم بر روی تک لایه سلولی SSN-1 جهت مشاهده آثار آسیب سلولی (CPE) و جداسازی ویروس.

آزمایش های مذکور با برنامه ریزی های انجام شده و بر اساس تقسیم کار صورت گرفته میان سه مجموعه یاد شده بصورت هماهنگ و همزمان صورت گرفت. در پایان تعدادی از نمونه های (CPE) مثبت برای مشاهده ذرات ویروسی نیز مورد آزمایش میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند.

همچنین به منظور تکمیل مطالعات در این تحقیق، آزمایش های هماتولوژی وسرمی ،باکتریولوژی و آزمایش سنجش فلزات سنگین نیز در پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری) توسط مجری محترم استانی، با هماهنگی مجری مسئول صورت گرفت. همچنین به منظور تائید تشخیص بیماری و انجام آزمایش بیماریزائی(Pathogenisity) عملیات مواجهه سازی در ماهیان گوپی و بچه ماهیان خاویاری (قره برون) صورت گرفت.

۱-۳-۲-صید و انتقال ماهیان

عملیات صید ونمونه برداری در سه مکان مزبور و به شرح ذیل صورت گرفت:

الف) پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری):

نمونه برداری طی دو مرحله انجام گردید. اولین مرحله در ۱۳۸۶/۴/۲۴ تعداد ۳۰ عدد ماهی کفال از صیدگاه ترکمن(خواجه نفس استان گلستان) تهیه و به پژوهشکده منتقل گردید. مرحله دوم نمونه برداری از مورخه ۸۶/۱۱/۲۷ الی ۸۶/۱۲/۲۰ تعداد ۵۶ عدد کفال واجد علایم بالینی و۳۰ عدد کفال سالم از پره های صیادی استان مازندران صید گردید. پس از صید ماهیان در وان های پلاستیکی حاوی آب دریا که با استفاده از کپسول اکسیژن هوادهی می شد قرار گرفته و بصورت زنده به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از انتقال، ماهیان به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در ونیروهایی که حاوی آب دریا بوده و هوادهی می شدند نگهداری شدند تا عوارض ناشی از استرس حمل و نقل در آنها به حداقل برسد و پس از این مدت عملیات بعدی شامل زیست سنجی و نمونه برداری از آنها صورت گرفت.

تصاویر شماره ۱۱: نمایی از محل نگهداری ماهیان طی۴۸ – ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری

ب) پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی)

در فاز عملیات صحرایی سرکشی به پره های استان های گیلان در طول فصول صید انجام شده و در صورت مشاهده کفال ماهیان دارای علایم بالینی همچون اتساع محوطه بطنی و شنای نامتعادل، ماهیان مزبور به صورت زنده به آزمایشگاه پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی منتقل شده وسپس به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در ونیروهایی که حاوی آب دریا بوده و هوادهی می شدند نگهداری شدند. این سرکشی های مداوم به پره های صیادی استان های گیلان در طول فصل صید در سه سال متوالی از مهر ماه ۱۳۸۵ تا فروردین ماه ۱۳۸۸ صورت گرفت و از میان کفال ماهیان صید شده تعداد ۳۱۲ کفال طلایی دارای علایمی همچون عدم تعادل در شنا، تیرگی رنگ، باد کردگی محوطه شکمی در محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم مشاهده و به پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی منتقل گردیدند.

ج) انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت)

نمونه برداری های انجام شده در این تحقیق بر روی نمونه های مولدین تاس ماهیان ایرانی صید شده از صیدگاههای خزر جنوبی به شرح جدول شماره ۳ انجام شده است.

جدول شماره ۳- نمونه های جمع آوری شده از ماهیان خاویاری جهت بررسی بیماری VNN طی سالهای ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۷

استان	سال	مغز	چشم	تخمک	اسپرم	جمع	
گیلان	۱۳۸۵	۱۱	۱۱	۵	۵	۳۲	
	۱۳۸۶	۱۰	۱۰	–	–	۲۰	
	۱۳۸۷	۱۳	۱۳	–	–	۲۶	
مازندران	۱۳۸۵	–	۳	۹	۸	۲۰	
	۱۳۸۶	–	–	–	۶	۶	
	۱۳۸۷	–	–	–	–	–	
گلستان	۱۳۸۵	۱۲	۶	۱۰	۴	۳۲	
	۱۳۸۶	–	–	–	–	–	
	۱۳۸۷	–	–	–	–	–	
جمع کل		۴۶	۴۳	۲۴	۲۳	۱۳۶	

درمجموع ۱۳۶ نمونه شامل: ۴۶ نمونه مغز، ۴۳ نمونه چشم، ۲۴ نمونه تخمک و ۲۳ نمونه اسپرم مولدین تاس ماهیان ایرانی جمع آوری و موردآزمایش قرارگرفت.

۲-۳-۲- زیست سنجی و نمونه برداری

برای جلوگیری از بروز کمترین استرس ابتداء ماهیان با ساچوک از داخل ونیرو صید شده و در داخل وان حاوی اسانس گل میخک به میزان ۰/۵ cc/L قرار گرفتند (فغانی ۱۳۸۵). پس از آنکه ماهی کاملا بیهوش می شد وزن و طول کل ماهیان اندازه گیری و ثبت می گردید. در این مرحله برای هر ماهی کدی ثبت می گردید تا پیگیری نتایج آزمایشات بعدی برای هر نمونه به راحتی انجام گردد. در این مرحله کلیه مشخصات ظاهری و زیست سنجی و نیز علایم بالینی ظاهری ماهیان ثبت گردید.

تصویرشماره ۱۲: محل بیهوش نمودن ماهیان با محلول گل میخک

تصویر شماره ۱۳: انجام زیست سنجی پس از بیهوشی

نمونه برداری بر اساس دستورالعمل اجرائی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی (VNN) از مغز و چشم ، خون وسرم ماهیان صورت می گرفت و بلافاصله اندامهای فوق الذکر جدا شده و درون لوله اپندورف استریل قرار گرفته و نمونه های مربوط به آزمایشات کشت سلولی و PCR در فریزر ^{oc}۸۰- قرار داده می شد. (لازم به ذکر است تمامی مراحل یاد شده با وسایل استریل و پوشیدن دستکش یکبار مصرف و در زیر هود میکروبی صورت گرفته است).

۳-۳-۲- آزمایش آسیب شناسی بافتی

ابتدا نمونه های بافت مغز و چشم ماهیان کفال به روش مناسب از ماهیان مبتلا استخراج شده و درمحلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد (تصویر شماره ۱۴) و محلول فرمالین پس از ۴۸ ساعت تعویض گردید و تا زمان تثبیت کامل در شرایط دور از نور مستقیم نگهداری شد. دو هفته پس از تثبیت کامل، پروسه آماده سازی بافت شامل مراحل آبگیری و شفاف سازی بافت با رقت های مختلف اتانل و گزیلل در دستگاه روتاری[۱] یا اتوتکنیکوم انجام شد. سپس نمونه ها را پارافینه کرده و به وسیله میکروتوم مقاطع بافتی به ضخامت ۵ µ از آنها تهیه شد. رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین وائوزین (H&E) انجام شد و مقاطع رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفت.

تصویر شماره ۱٤ : موقعیت قرار گرفتن لوب های مغز در ماهی کفال

[۱] - Tissue processor

٤-٣-٢-آزمایش هماتولوژی وسرمی

از ماهیان نمونه برداری شده طی دو مرحله از صید گاه ترکمن به تعداد ۳۰ عدد ماهی و نیز ۸۶ عدد ماهی صید شده از استان مازندران (۵۶ عدد کفال واجد علایم بالینی و۳۰ عدد کفال سالم) پس از ثبت مشخصات و انجام زیست سنجی با استفاده از سرنگ استریل از ورید دمی ماهیان خونگیری به عمل آمد. از هر ماهی ۲cc خون گرفته شد که ۱cc از آن به میکروتیوبهای اپندورف حاوی ۱۰۰ لاندا هپارین ۵۰۰۰ واحد و ۱cc دیگر به میکروتیوب بدون هپارین منتقل شدند. از خون هپارینه برای شمارش کلی گلبولهای قرمز، شمارش کلی گلبولهای سفید، شمارش تفریقی گلبولهای سفید، میزان هموگلوبین ودرصد هماتوکریت استفاده شد. همچنین اندیسهای خونی شامل وزن هموگلوبین داخل سلولی (MCV)[1] ،میزان متوسط وزن هموگلوبین داخل سلولی (MCH)[2] و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی(MCHC)[3] نیز محاسبه گردید. در شمارش کلی گلبولهای قرمز و سفید، نمونه خون با استفاده از محلول ریس رقیق و با لام نئوبار شمارش گردیدند. اندازه گیری هماتوکریت با استفاده از لوله میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. اندازه گیری هموگلوبین با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین انجام گردید. در شمارش تفریقی گلبولهای سفید، پس از تهیه گسترش از نمونه ها، گسترش ها با گیمسا رنگ آمیزی و در هر گسترش ۱۰۰ عدد گلبول سفید شمارش و تعداد هر نوع گلبول بصورت درصد بیان گردید. برای تعیین میزان حجم گلبولی(MCV) و میزان هموگلوبین گلبولی (MCH) از روابط زیر استفاده گردید(طبرستانی۱۳۸۴، عامری مهابادی ۱۳۷۸).

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times 10}{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون}}$$

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین} \times 10}{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون}}$$

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین} \times 100}{\text{هماتوکریت}}$$

از نمونه خون های غیر هپارینه پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور، سرم جداسازی و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در زمان انجام آزمایش با استفاده از کیت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر فاکتورهایی بیوشیمیایی نظیر میزان پروتئین تام سرم و آلبومین، فاکتورهای سرمی

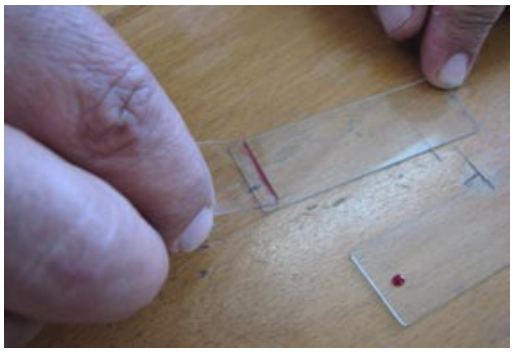
[1] - Mean corpuscular volume
[2] - Mean Corpuscular Hemoglobin
[3] - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

مانند IgM تام، C3 و C4 و آنزیمهای آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) نیز ارزیابی گردید(بینایی ۱۳۸۶).

تصویرشماره ۱۵: خونگیری با سرنگ استریل از ساقه دمی

تصویر شماره ١٦: انتقال نمونه خون به لوله های واجد و فاقد هپارین

تصویر شماره ۱۷: آماده سازی نمونه ها جهت قرائت هماتوکریت



تصویرشماره ۱۸: تهیه گسترش خون جهت رنگ آمیزی و شمارش تفریقی گلبولهای سفید

۵-۳-۲-آزمایش ایمونوهیستوشیمی

انجام آزمایش به روش توصیه شده توسط .Aquatic diagnostics Co به ترتیب زیر انجام شد:

۱- قالب های پارافینه از بافت مغز و چشم تثبیت شده در فرمالین تهیه شد.

۲- مقاطع بافتی به ضخامت ۵µ با کمک میکروتوم تهیه شد.

۳- پارافین زدایی و آبدهی مجدد به مقاطع به ترتیب به کمک Xylene (۲ بار بمدت ۵ دقیقه)، اتانل ۱۰۰ درصد(۵ دقیقه)، اتانل ۷۰ درصد(۳ دقیقه) و سپس شستشو با آب مقطر انجام شد.

۴- مقاطع بافتی در اتاقک مرطوب قرار گرفت(در تمام طول آزمایش باید از خشک شدن مقطع جلوگیری شود).

۵- بوسیله Wax pap دور بافت بر روی لام علامت گذاری گردید.

۶- برای غیر فعال کردن فعالیت پراکسیداز داخلی، مقاطع را با H_2O_2 حاوی متانول بمدت ۱۰ دقیقه در ^{oC} ۲۲ قرار گرفت.

۷- مقاطع ۳ بار با PBS شستشو داده شد.

۸- باندهای غیر اختصاصی به کمک سرم نرمال بزی رقیق شده در TBS (به نسبت ۱ به ۱۰) بمدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق غیر فعال شدند.

۹- سرم را دور ریخته و اضافات سرم با کمک دستمال کاغذی از کناره های لام جمع آوری شد.

۱۰- ۱۰۰ – ۵۰ میکرولیتر از آنتی نوداویروس (Mab) ساخت (Aquatic diagnostics Co.) بر روی محل مقطع بافتی(بسته به وسعت مقطع) قرار داده شد ودر اتاقک مرطوب نگهداری شد.

۱۱- مقاطع ۳ بار با PBS شستشو داده شدند.

۱۲- آنتی بادی بزی ضد ایمونوگلوبولین موشی کنژوگه شده با بیوتین ساخت (Aquatic diagnostics Co.) (۱ به ۱۰ رقیق شده در PBS ۱٪ وزن به حجم BSA) اضافه شد.

۱۳- اسلایدها ۳ بار با PBS شستشو داده شد.

۱۴- استرپتاویدین- پراکسیداز (Daco Co.) (۱ درصد در PBS ۱ ٪ در BSA) بمدت ۳۰ دقیقه بر روی اسلاید قرار گرفت.

۱۵- ۳ بار شستشو با PBS

۱۶- برای قابل مشاهده شدن واکنش ، اسلاید ها به مدت ۱۰ دقیقه با محلول DAB انکوبه شد.

۱۷- اسلاید ها با PBS شستشو داده شد و به مدت ۴-۳ دقیقه در هماتوکسیلین قرار گرفت.

۱۸- اسلاید ها بمدت ۱۰ دقیقه در آب قرار گرفت.

۱۹- آبگیری مجدد اسلاید ها با قرار دادن آنها در اتانل ۷۰ درصد(۳ دقیقه)، اتانل ۱۰۰ درصد (۵ دقیقه) و Xylene (۲ بار بمدت ۵ دقیقه) انجام شد.

۲۰- اسلاید ها با Pertex مونته شد و در زیر هود شیمیایی قرار داده شد.

۲۱- اسلاید ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد و بافتهای آلوده به رنگ قهوه ای طلایی براق با رنگ آمیزی DAB دیده می شود (Lai و همکاران، ۲۰۰۱).

٦-۳-۲-کشت سلول

الف- تلقیح نمونه بر روی تک لایه سلولی SSN-1 :

۱- نمونه های مغز و چشم ماهی در شرایط استریل خارج گردید و به نسبت یک گرم به ازای ۱۰ میلی لیتر محیط EMEM حاوی ۱۰۰میلی گرم استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد پنی سیلین به ازای هی میلی لیتر محیط، هموژن شد.

۲- نمونه های هموژن شده در لوله فالکون ریخته شد ودر ۲۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید.

۳-مایع رویی با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر گردید.

۴- ۱۵۰ میکرولیتر از هموژن فیلتر شده به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ساخت شرکت فالکون حاوی تک لایه سلولی SSN-1 (Frerichs ، ۱۹۹۶) تلقیح گردید و بدین منظور از محیط کشت EMEM دارای ۵ درصد سرم جنین گاوی(FCS) استفاده شد.

۳- پلیت مذکور در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد(OIE ، 2006).

ب – بررسی سلول های تلقیح شده:

۱- سلول های تلقیح شده بمدت ۱۰ روز در زیر میکروسکوپ اینورت برای مشاهده آثار آسیب سلولی(CPE) بررسی گردید.
۲- در صورت مشاهده آسیب سلولی(CPE) مراحل تشخیص ویروس با استفاده از روش های Nested RT-PCR و پادتن های درخشان غیر مستقیم انجام شد.
نکته: آثار آسیب سلولی(CPE) در تیره سلولی SSN-1 به صورت سلولهای گرانوله گرد یا باریک شده حاوی واکوئول است.(OIE ، 2006)

۷-۳-۲-آزمایش پادتن های درخشان به روش غیرمستقیم (IFAT):

این آزمایش بر روی مقاطع بافتی یا تک لایه سلولی آلوده شده جهت رد یابی وتائید آنتی ژن های ویروسی بر روی نمونه های مثبت مورد آزمایش در کشت سلولی صورت گرفت.
الف) مراحل آزمایش IFAT بر روی تک لایه سلولی براساس روش توصیه شده OIE (۲۰۰۶) بدین شرح بود:

۱- پلیت ۲۴ خانه حاوی تک لایه سلولی SSN-1 با حداقل ۷۰ درصد یکنواختی سلولها در گوده ها که به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه گردید.
۲- سوسپانسیون ویروسی با رقت ۱۰ درصد در محیط EMEM به لایه سلولی تلقیح گردید.
۳- پلیت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد بمدت ۷۲-۴۸ قرار داده شد.
۴- محیط کشت روی سلول ها تخلیه شده و با PBS شستشو شده و سپس با متانول بمدت ده دقیقه تثبیت گردید.
۵- پلیت در زیر هود شیمیایی قرار گرفته تا کم کم خشک گردد.
۶- آنتی بادی خرگوشی ضد بتا نودا ویروس(Aquatic diagnostics Co. و دانشگاه تکنیکال دانمارک) بر روی لایه سلولی قرار گرفت و بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد و در اتاقک مرطوب نگهداری گردید.
۷- چهار بار شستشو با PBS-tween 80 (PBST) انجام شد.
۸- آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین خرگوشی کنژوگه شده با فلورسئین ایزوتیوسیانات (شرکت Aquatic diagnostics بر روی لایه سلولی قرار گرفته و بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.
۹- چهار بار شستشو با PBS-tween 80 (PBST) صورت گرفت.

۱۰-پلیت درزیر میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار گرفت.

ب) مراحل آزمایش IFAT بر روی مقاطع بافتی بر اساس دستورالعمل OIE (۲۰۰۶) بدین شرح بود:
ابتدا قطعه ای از بافت مغز یا چشم را به صورت فشاری بر روی لام قرار داده و اثر آن به روش Imprinting بر روی لام ایجاد گردید سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید تا اثر نمونه بر روی لام خشک گردد سپس با ریختن استن سرد بر روی لام نمونه را تثبیت کرده و در فویل آلومینیومی بسته بندی کرده و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید . آزمایش نمونه ها درآزمایشگاه مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی تهران طبق دستورالعمل OIE ، ۲۰۰۶ و به طریق ذیل و بر اساس مراحل بالا صورت گرفت.

ت) مراحل آزمایش IFAT بر روی نمونه های فیکس شده بافتی حاصله در آسیب شناسی بر اساس دستورالعمل OIE (۲۰۰۶) به شرح ذیل انجام پذیرفت:

۱- نمونه بافتی مغز و چشم در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شده و پارافینه گردید.
۲- مقاطع بافتی با ضخامت ۵ µl تهیه شده و پس از پارافین زدایی در داخل PBS قرار گرفت تا مجددا آبدهی گردد.
۳- مقاطع با PBS سرد شستشو داده شد.
۴- بقیه مراحل مشابه مراحل بالا (از مرحله ۶ به بعد) می باشد.
۵- در صورت آلودگی سلول به ویروس، رنگ فسفری طلایی براق در داخل سیتوپلاسم سلولهای مغز، نخاع و شبکیه قابل مشاهده است.

شایان ذکر است در انجام آزمایشات فوق الذکر علاوه بر آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده در شرکت Aquatic diagnostics Co. از آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده در دانشگاه استرلینگ ، Aquatic diagnostic Ltd.) و آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده درآزمایشگاه رفرانس ویروس شناسی دانشگاه تکنیکال دانمارک نیز استفاده گردید.

۸-۳-۲- انجام آزمایشات مولکولی (آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز)[1]

جهت انجام آزمایشات مولکولی از دستورالعمل کیت IQ2000 ™ که حاوی کیت استخراج RNA و کیت RT – PCR به همراه کنترل مثبت و منفی بود استفاده گردید. برای این کار ابتدا در شرایط آسپتیک جمجمه ماهیان را

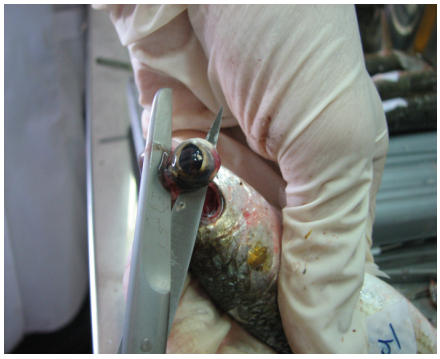
[1]- Polymerase Chain Reaction (PCR)

شکافته و تمام قسمتهای مغز شامل مغز جلویی[۱]، لبهای بینایی مغز میانی[۲]، مخچه[۳]و بصل النخاع[۴] از جمجمه خارج گردید. در این مرحله مغز ماهیان به دو قسمت تقسیم شده و نیمی از آن برای انجام آزمایشات مولکولی به ظروف حاوی الکل ۷۰٪ منتقل شد. همچنین یکی از چشمها نیز در شرایط آسپتیک جدا و برای انجام آزمایشات فوق به ظرف حاوی الکل انتقال داده شد.

همچنین اسپرم و تخمک ماهیان مولد خاویاری نیز در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) بوسیله این کیت مورد بررسی قرار گرفت.

ادامه انجام آزمایشات در جهت استخراج RNA و انجام آزمایشات RT – PCR و Nested - PCR و بردن محصول ازمایش به روی ژل آگارز و تفسیر نتایج بر اساس دستورالعمل کیت IQ2000 ™ انجام شد که اصل آن در ضمائم موجود می باشد.

تصویر شماره ۱۹: تهیه نمونه مغز از ماهیان



تصویر شماره ۲۰: تهیه نمونه چشم از ماهیان

تصویر شماره ۲۱: برداشت نمونه مغز جهت انجام آزمایش PCR

تمامی مراحل این آزمایش با کمک کیت تجاری شرکت IQ2000 ™ (تایوان) انجام شد.

---

۱ - Ferebrain
۲ - Optic lobs of midbrain
۳ - Cerebellum
۴ -Medulla oblangata

استخراج RNA :

۱ – میزان ۲۰mg از نمونه های مغز، چشم ماهی، اسپرم یا تخمک ماهی را درتیوپ اپندروف ۱/۵ ml قرار داده و به آن ۵۰۰ µl محلول استخراج RNA (ساخت شرکت IQ2000 ™) اضافه گردید.

۲ – نمونه ها با کمک قیچی نوک تیز در داخل میکروتیپ خرد و هموژن گردید.

۳ – ۱۰۰ µl کلروفرم به تیوپ مذکور اضافه شده و بمدت ۲۰ ثانیه Vortex صورت گرفت و در درجه حرارت آزمایشگاه بمدت ۲ تا ۳ دقیقه قرارگرفته و سپس درrpm ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه و در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید.

۴ – ۲۰۰ µl از فاز شفاف آبی بالایی را به یک میکروتیوپ ۰/۵ ml استریل وارد کرده و ۲۰۰ µl ایزوپروپانل به آن اضافه شد.

۵ –بسیار کوتاه Vortex کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ ودر دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید.

۶ – پس از تشکیل پلت، ایزوپروپانل دور ریخته شد.

۷ – ۰/۵ ml اتانل ۷۵ ٪ به تیوپ مذکور اضافه کرده و بمدت ۵ دقیقه در rpm ۹۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ کرده تا پلت شفاف RNA تشکیل گردد.

۸ – سپس اتانل را دور ریخته و به پلت اجازه داده تا خشک گردد.

۹ – پلت مذکور را در ۲۰۰ µl آب مقطر درمان شده با دی اتیل پیروکربنات(DEPC) حل گردید.

انجام RT-PCR :

طبق دستورالعمل شرکت IQ2000 ™ به شرح زیر عمل شد:

۱- مخلوط مواد مصرفی واکنش RT-PCR را بر اساس تعداد نمونه طبق جدول ۴ آماده گردید:

RT-PCR Pre-mixed Reagent	۷ µL
IQzyme™ 2unit/ 1µl	۰/۵ µL
Reverse Transcription(RT) Enzyme mix	۰/۵ µL
میزان مخلوط مورد نیاز هر واکنش	۸ µL

۲- ابتدا به تعداد نمونه های مورد آزمایش میکروتیپ ۰/۲ میلی لیتری برداشته و مشخصات یا شماره نمونه ها روی آنها ثبت گردید.

۳- ۸ µl از مخلوط تهیه شده به هر میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری که دارای برچسب مشخصات است اضافه گردید.

۴ – در هر میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری حاوی مخلوط ۲ µl از RNA استخراج شده نمونه یا کنترل مثبت یا کنترل منفی اضافه شد.

۵– واکنش RT-PCR طبق برنامه زیر در دستگاه ترمال سایکلر اجراگردید:

ابتدا ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه که به این ترتیب cDNA ساخته شد و بلافاصله وارد مرحله بعد گردید.

مرحله بعد شامل ۱۵ سیکل بودکه در هر سیکل ابتدا ۲۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۹۴ بعد ۲۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۶۲ و سپس ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۷۲ قرار گرفت.

در مرحله پایانی ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۷۲ و ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۲۰ قرار گرفته و واکنش پایان یافت.

انجام Nested-PCR :

۱ – مخلوط Nested-PCR طبق جدول ۵ تهیه گردید:

Nested-PCR Pre-mixed Reagent µIQzymeTM , 2 unit/ l	۱۴ µL ۱ µL
میزان مخلوط مورد نیاز برای هر واکنش	۱۵ µL

۲ – پس از اتمام RT-PCR ، ۱۵ µl از میکس تهیه شده را به هر میکروتیوپ اضافه کرده و واکنش Nested –PCR بر اساس برنامه زیر اجرا گردید:

مرحله اول شامل ۳۰ سیکل بود که در هر سیکل به ترتیب ۲۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۹۴ سپس ۲۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۶۲ و در پایان ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۷۲ قرار داده شد.

درمرحله بعد ابتدا ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۷۲ سپس ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۲۰ قرار گرفته و واکنش خاتمه یافت.

الکتروفورز محصول PCR

محصول نهایی PCR بر روی ژل آگارز ۲ در صد محتوی ۰/۵-۱µg/ml اتیدیوم بروماید بمدت ۶۰ دقیقه تحت ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید.

۹-۳-۲- میکروسکوپ الکترونی

برای مشاهده ذرات ویروس در داخل سلول ها از روش TRANSMISSON ELECTRON MICROSCOPY یا روش (TEM) استفاده شد و نمونه ها بر اساس روش توصیه شده توسط Chi و همکاران (۱۹۹۹) آماده گردید.
ابتدا نمونه های مغز و چشم ماهی را در گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد در PBS ۰/۱ مولار با pH= ۷/۲ بمدت ۲ ساعت قرار داده سپس ۳ بار با فسفات بافر یا سدیم کاکودیلات ۱٪ شستشو داده شد. مرحله تثبیت دوم را با اضافه کردن اسمیوم تتراکساید ۱٪ سرد بمدت ۱/۵ ساعت انجام داده و پس از آبگیری بافت را در رزین قرار داده و با دستگاه اولترا میکروتوم برشهای بسیار نازک تهیه گردید. مقاطع مذکور بر روی گرید مسی قرار داده شد و با اورانیل استات ۲٪ رنگ آمیزی شده و بوسیله دستگاه میکروسکوپ الکترونی تصویر برداری گردید.

۱۰-۳-۲- تهیه نمونه وانجام آزمایشات باکتری شناسی

به منظور تکمیل آزمایش های طرح ملی و بررسی احتمال وجود سایر عوامل بیماریزا در بروز تلفات عدیده اخیر در کفال ماهیان ، با هماهنگی مجری مسئول دو آزمایش تکمیلی باکتریولوژی و سنجش فلزات سنگین برروی نمونه های صید شده در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر(ساری) صورت گرفت.
برای انجام آزمایشات باکتری شناسی از مغز و کلیه ۲۳ نمونه ماهی با علائم بالینی از میان ۵۶ ماهی صید شده در فصل زمستان سال ۱۳۸۶، کشت به عمل آمد به این ترتیب که قسمتی از مغز که در مرحله نمونه برداری برای آزمایشات مولکولی جداشده بود به محیط لاکتوز براث[۱] منتقل شد. جهت کشت از کلیه نیز در سطح شکمی ماهی با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شده و در کنار شعله و در شرایط آسپتیک محوطه بطنی باز گردید. در ابتدا وضعیت احشا ماهیان و وجود علایم بالینی در این بخش ارزیابی گردید و سپس از کلیه ماهی بر روی محیط آگار خوندار[۲] کشت به عمل آمد. ظروف نمونه های مغز و پلیتهای کشت داده شده در دمای ۲۵ – ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت با ایجاد کدورت در محیط لاکتوز براث از محیط فوق به روی محیط آگار خوندار کشت داده شد. با رشد باکتریهای کشت داده شده از مغز و

۱- Lactose broth
۲- Blood agar

کلیه، متعاقب آن آزمایشات تکمیلی در خصوص شناسایی اولیه باکتری مورد نظر انجام شد(سلطانی و همکاران ۱۳۸۳).

۱۱-۳-۲-تهیه نمونه و سنجش فلزات سنگین

برای آماده سازی نمونه ابتدا از بافتهای کبد، عضله، آبشش و محتویات دستگاه گوارش جدا و با استفاده از دستگاه Freeze drier خشک و بر روی هیتر عمل هضم اسیدی انجام شد. شیوه آماده سازی بطریق هضم بسته با اسید و با استفاده از دستگاه جذب اتمی[۱] مجهز به سه سیستم شعله ، گرافیتی و سیستم بخار با لامپ زمینه دوتریم اندازه گیری گردید. دقت و صحت روش با تکرار نمونه ها انجام گردید(Moopam ۱۹۸۳).

۱۲-۳-۲-آزمایش مواجهه سازی(Challenge):

انجام آزمایش بیماری زایی (پاتوژنیسیته[۲]) درماهیان سالم از مهم ترین روش های مورد استفاده جهت تأیید اطلاعات بدست آمده قبلی و تایید تشخیص یک بیماری جدید و نوظهور می باشد (OIE,2006). در این روش عامل بیماری زا که در مراحل قبل جداسازی شده است با ماهیان سالم تماس داده شده (Challenge) و اجازه بروز بیماری در ماهیان سالم در محیط کاملاً استریل از لحاظ دیگر عوامل بیماریزا داده می شود. پس از بروز علائم بالینی در ماهیان، مجدداً کلیه مراحل تأییدی بیماری که در مراحل اولیه تشخیص بیماری انجام شده است باید تکرار گردد. پاسخ های یکسان در هر دو مرحله در همه آزمایشات دلیلی بر تأیید شدن مشخصات ارائه شده برای عامل بیماری خواهد بود. در این بخش به مراحل انجام این قسمت از طرح ملی که در پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور (انزلی) صورت گرفت پرداخته می شود:

- **روش های مختلف مواجهه سازی :**

۱. روش حمام (Bath challenge)

در این روش که برای ماهی های با اندازه کوچک و بچه ماهیان مورد استفاده قرار می گیرد، عامل ویروسی به مقدار مشخص تعریف شده برای ویروس ($TCID_{50}$) در هر میلی لیتر از آب مورد آزمایش قرار داده شده و اجازه تماس مستقیم ماهی با ویروس و جذب آن از طریق جلدی و دستگاه گوارش و آبشش ها داده می شود و ویروس جذب شده مسیر خود را تا رسیدن به بافت هدف طی خواهد نمود.

۲. روش تزریقی (Injection test)

---

[۱]- Atomic absorbtion
[۲]- Pathogenicity test

در این روش که برای ماهی های بزرگ تر مانند ماهی های مولد استفاده می شود، و روش مطمئن تری نیز می باشد، ویروس در بافت هدف ویروس تزریق شده و اجازه بروز علائم بالینی به ماهی در محیط کاملاً استریل از دیگر عوامل بیماری زای احتمالی داده می شود.

در هر دو روش باید محیطی که ماهی در آن قرار می گیرد از لحاظ همه شرایط تحت کنترل باشد و هیچ نوع آلوده کننده جانبی دیگر باعث بروز بیماری در ماهی های مورد آزمایش نگردد. وقوع هر نوع عارضه ای متفاوت در جمعیت های مورد آزمایش باعث افزایش خطا در نتایج و نهایتاً عدم تأیید آزمون خواهد شد.

در هر دو روش(B.C) ((Bath Challenge) و (IC) (Injection Challenge) حداقل ۳۰ عدد ماهی برای هر گروه انتخاب شده باید در نظر گرفته شود همچنین داشتن جمعیت تکرارها حداقل دو جمعیت تکرار و یک جمعیت شاهد (کنترل) مورد نیاز است.

- **انتخاب گونه**

در مطالعات انجام شده جهت جدا سازی و بررسی ویروس بیماری نکروز عصبی در ایران ماهی مورد مطالعه کفال طلائی بود. این گونه به لحاظ بیولوژیکی گونه ای بنتوز خوار بوده و در بستر دریا زندگی می کند. در بررسی ها ومطالعات انجام شده قبلی بر روی این گونه آنچه که کاملاً مشهود است سازگاری سخت این گونه با شرایط اسارت درآکوآریوم می باشد. همچنین با توجه به زمان انجام این آزمایش در ایران که در ابتدای فصل پاییز (September) بود صید بچه ماهی کفال از دریا میسر نبود. در انجام روش B.C نیاز به زمان طولانی نگهداری ماهی در آکوآریوم می باشد. با توجه به دلایل ارائه شده و پس از مشورت با استاد مشاور طرح ملی (Prof.G.Bovo) در ایتالیا ماهی گوپی (Guppy) به عنوان گونه جایگزین جهت آزمایش بیماری زایی انتخاب شد.

ماهی گوپی Guppy (*Poecilia retriculata*) از جمله ماهیان مستعد و حساس به بیماری نکروز عصبی ویروسی است که در کشور سنگاپور ابتلای آن به بیماری VNN گزارش شده است. از جمله خصوصیات این ماهی آداپتاسیون بالا و پذیرش شرایط آکواریومی خوب و تکثیرمناسب و بازماندگی بالا می باشد.

- **تعداد ماهیان انتخاب شده**

برای انجام آزمایش B.C باید از جمعیت آماری مناسب استفاده شود. برای هر تیمار حداقل ۳۰ عدد ماهی با ۳ تکرار و یک جمعیت کنترل در نظر گرفته شد. درآزمایش انجام شده دو تیمار انتخاب گردید لذا تعداد ماهی مورد استفاده عبارت بودند از :

قطعه ماهی ۲۴۰ = ۳۰ ×(۳+۱) × ۲

- **لوازم و تجهیزات آکوآریومی:**

برای انجام آزمایش B.C از آکوآریوم های شیشه ای به ابعاد ۴۰× ۴۰ × ۴۰ (۵۴ لیتری) تهیه شده در بخش ویروس شناسی پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی کشور(انزلی) استفاده گردید. تعداد هشت آکوآریوم مجهز به پمپ های هواده و همچنین فیلتر های جاذب NH_4 و ذرات معلق جهت آزمایش در نظر گرفته شد.

آکوآریوم ها به مقدار ۴۰ لیتر برای ۳۰ عدد ماهی حدود ۴-۲ گرمی آبگیری شدند. تعویض آب آکوآریوم ها جهت کنترل وضعیت بهداشتی و آلودگی احتمالی هر هفته یک بار انجام می گردید. آب مورد استفاده آب لوله کشی شهری بود که ۲۴ ساعت قبل از استفاده جهت از بین رفتن اثر کلر در محفظه های استریل نگهداری می شد.

ماهی های گوپی ۱۵ روز قبل از مواجهه سازی به آزمایشگاه منتقل و در شرایط سازگاری با محیط آکوآریوم قرار گرفتند. جهت غذادهی ماهی ها از غذای پلت تولیدی کارخانه چینه استفاده گردید.

- **تهیه سوپرناتانت (Supernatant)**

Infected cell line media from naturally infected Fish

برای تهیه سوپرناتانت Supernatant آلوده به ویروس VNN از محیط تیره سلولی SSN-1 آلوده به ویروس که در آن CPE واضح و به مقدار زیاد دیده شده بود استفاده گردید.

پس از جداسازی سلول ها از بستر محیط کشت و افزودن محیط EMEM به آنها مراحل Redundancy و توسعه CPE و تکثیر ویروس تا رسیدن به ($TCID_{50}$) برابر 10^4 ادامه یافت سپس محیط کشت در دور ۱۵۰۰ به مدت ده دقیقه و در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید.

سپس محیط کشت حاوی ویروس در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ۳ بار منجمد و ذوب گردید (Freezing & Thawing) با این کار دیوار سلول های محیط تخریب و ویروس درون محیط کشت قرار می گیرد. محیط رویی محلول سانتریفوژ شده، پس از جدا سازی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و در دورRPM ۴۰۰۰ مجدداً سانتریفوژ شد.

- **انواع تیمار و مدت زمان مورد استفاده :**

در روش B.C بر روی ماهی گوپی از محلول ویروسی یکسان استفاده گردید به این صورت که در تیمار I مقدار ۹۰ قطعه ماهی در درون سه آکوآریوم ۲ لیتری شیشه ای مجهز به هوادهی به مدت ۲ ساعت و با 50^{CC} از محلول ویروسی مجاورت داده شدند. پس از اتمام ۲ ساعت ماهی های گروه های ۳۰ تایی در درون سه آکوآریوم ۵۴ لیتری منتقل گردیدند. یک گروه از ماهی های گوپی نیز بدون آلوده شدن به محلول ویروسی به عنوان کنترل تیمار I درون یک آکوآریوم مجزا قرار داده شد.

در تیمار II از همان محلول ویروسی استفاده گردید اما مدت زمان قرار گرفتن ماهی ها در مجاورت با محلول ویروسی ۴ ساعت در نظر گرفته شد. و در تحت همان شرایط پس از اتمام زمان ۴ ساعت در آکوآریوم های ۵۴ لیتری قرار داده شدند.

در طول نگهداری ماهی ها در آکوآریوم تا شروع اولین علائم بالینی هوادهی و تغذیه ماهی ها بر اساس برنامه غذا دهی منظم انجام می گردید. بطور کلی جهت اطمینان از تائید تشخیص عامل بیماری در این طرح ملی، آزمایش مواجهه سازی در دو گونه از ماهیان حساس به شرح ذیل انجام شد:

مواجهه سازی در ماهیان گوپی:

همانگونه که در قسمت کلیات بصورت مشروح بیان شد ابتدا سلول SSN-1 به تعداد زیاد در فلاسک های کشت cm^2 ۷۵ به تعداد زیاد کشت داده شد. سپس تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی گوپی خریداری شده و در مدت ده روز در شرایط آکوآریومی موجود در پژوهشکده آداپته گردید. تلقیح سلولهای SSN-1 با سوپرناتانت سلولهای دارای CPE که از قبل آماده شده بود انجام شد.

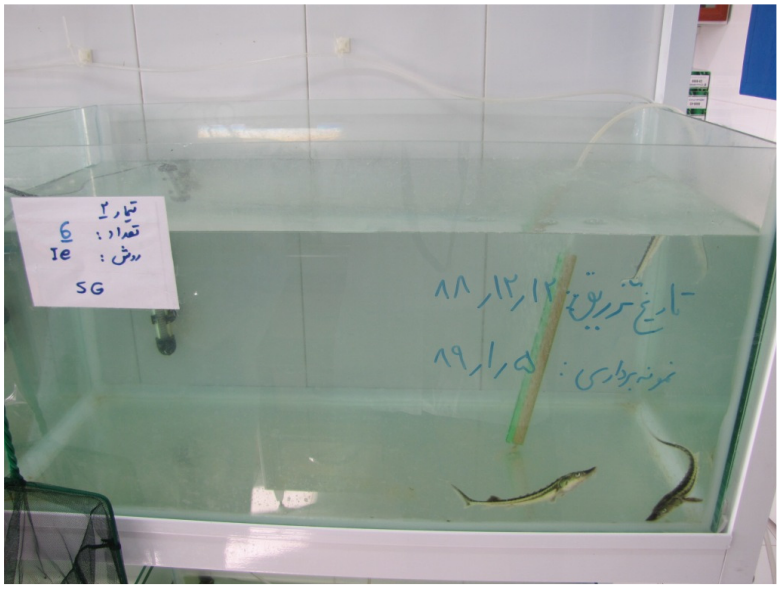
برای مواجهه سازی، سلولهای دارای CPE را منجمد و ذوب کرده وبمدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور و ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید.

ماهیان به دو گروه تیمار و هر تیمار واجد سه تکرار و یک گروه کنترل بود. گروه های تیمار در ظروف شیشه ای دارای هواده با ^{cc}۵۰ سوپرناتانت سلولی دارای CPE با $TCID_{50}$ مساوی با ^{4}۱۰ پس از فیلتر شدن با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون، بمدت ۲ ساعت در تیمار اول و۴ ساعت در تیمار دوم مواجهه سازی شده و به آکوآریوم های مجزا و دارای هواده منتقل شدند. مشاهده علایم به صورت روزانه انجام شده و در صورت بروز تلفات یا مشاهده علایم بیماری، نمونه برداری برای آزمایشات پاتولوژی، کشت سلولی و میکروسکوپ الکترونی انجام شد.

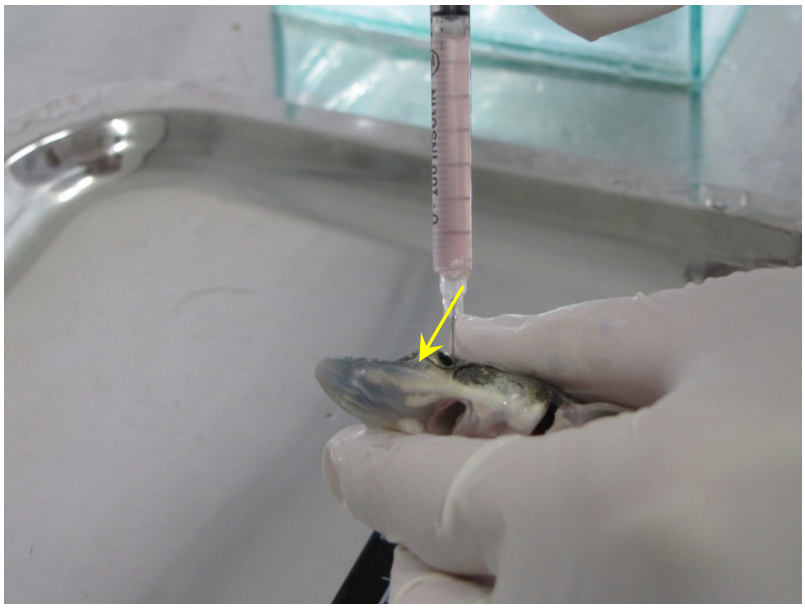
مواجهه سازی در بچه ماهیان قره برون:

تعداد ۸۰ عدد بچه ماهی قره برون با وزن حدود ۱۰-۵ گرم تهیه شده و بمدت یک هفته در شرایط آکوآریوم دارای هواده سازگار گردیدند. سوپرناتانت سلولهای آلوده طبق روش بالا تهیه شده و پس از فیلتر شدن با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون به میزان ۰/۵ میلی لیتر در پشت حدقه چشم ماهیان دو گروه کنترل تزریق شد و برای مقایسه به میزان مساوی محیط کشت استریل به ماهیان گروه کنترل تزریق گردید. مشاهده علایم تا یکماه انجام گرفت و تعویض آب به میزان ۲۰ درصد حجم آکوآریوم ها به صورت روزانه انجام شد(تصاویر ۲۲ تا ۲۴).

تصویر ۲۲: آداپتاسیون و نگهدار ی ماهیان در آکوآریوم قبل و پس از تزریق



تصویر شماره ۲۳: آداپتاسیون و نگهداری ماهیان در آکوآریوم پس از تزریق

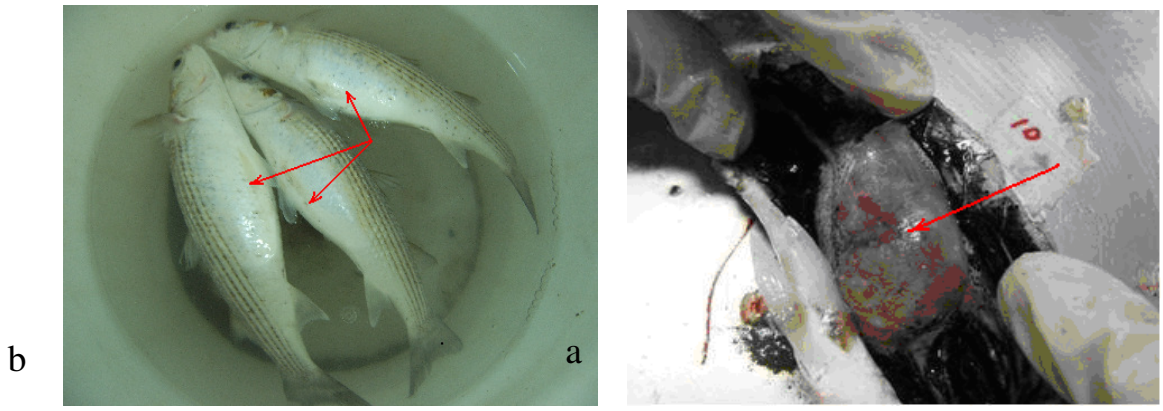


تصویر شماره ۲٤: تزریق سوپرناتانت سلولی در پشت حدقه چشمی بچه ماهی قره برون(پیکان)

۳-نتایج

۱-۳- زیست سنجی و مشاهدات بالینی

در سرکشی های مداوم به پره های صیادی استان های گیلان و مازندران در طول فصل صید در سه سال متوالی از مهر ماه ۱۳۸۵ تا فروردین ماه ۱۳۸۸ تعداد ۳۱۲ کفال طلایی در استان گیلان و ۵۶ نمونه در استان مازندران و گلستان که دارای علایمی همچون عدم تعادل در شنا، تیرگی رنگ، باد کردگی محوطه شکمی در محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم مشاهده گردید که در نمونه های استان گیلان درکالبد گشایی هیچ علامتی بجز بادکردگی واضح در کیسه شنا نداشتند.(تصویر شماره ۲۵)



تصویر شماره ۲۵: کیسه شنای باد کرده در کفال طلایی دریای خزر(پیکان) (a)؛ بادکردگی محوطه شکمی و خوابیدن روی سطح آب درحالیکه شکم به سمت بالا قرار دارد(پیکان) (b)

ولی در نمونه های صید شده در استان مازندران و گلستان شواهد حاکی از بروز علائم متفاوتی از نمونه های استان گیلان بود.در پژوهشکده اکولوژی مازندران طی نمونه برداری در مرحله اول(نمونه های صید شده از صیدگاه ترکمن ، استان گلستان در مورخه ۸۶/۴/۲۴) علایم ظاهری خاصی جز در بعضی موارد پرخونی ویا خونریزی در سطح شکمی و قاعده باله ها وجود نداشت. در هیچیک از ماهیان صید شده اتساع محوطه بطنی مشاهده نشد. درکالبد گشایی نیز علامت خاصی وجود نداشت.

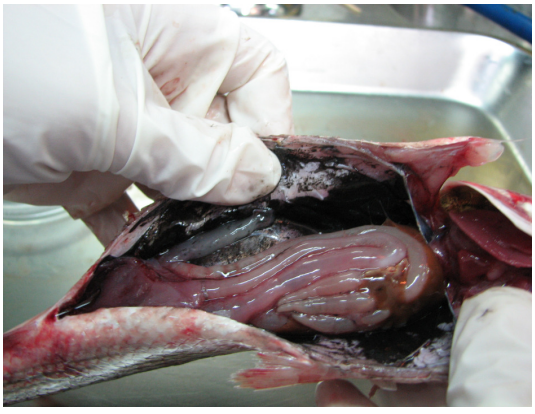
لیکن در مرحله دوم نمونه برداری(مورخه ۸۶/۱۱/۲۷ الی ۸۶/۱۲/۲۰) شرایط ماهیان بسیار متفاوت بود. با توجه به آنچه که در علائم بالینی و اندامهای داخلی ماهیان مشاهده شد، کفال ماهیان مبتلا را میتوان به دو گروه ذیل تقسیم کرد:

الف – در گروه اول عمده علایم بالینی بصورت تورم در ناحیه بطنی مشاهده شد. در این دسته از ماهیان در بعضی موارد اتساع محوطه بطنی به حدی بود که ماهی حتی پس از تحریک قادر به فرو رفتن به عمق آب نبود. در بقیه چنانچه ماهی تحریک می شد به عمق فرو می رفت ولی پس از مدت اندکی مجدد به سطح آب می آمد.

بیحالی یکی دیگر از علایم این ماهیان بود، بطوریکه فقط ماهیان بطور درجا در سطح آب باله های خود را حرکت میدادند و شنای فعال نداشتند. در سطح بدن یا علایم خاصی وجود نداشت و یا درجات مختلفی از خونریزی در قاعده باله ها و نیز اطراف چشم مشاهده میشد. در مواردی نیز بیرون زدگی چشمها بصورت یک یا دو طرفه دیده شد. در کالبد گشایی این ماهیان مهمترین یافته تورم شدید کیسه شنا بود. هیچگونه مایعی در داخل محوطه بطنی مشاهده نگردید. کیسه صفرا در این ماهیان کاملا پر بود که نشان از عدم تغذیه طولانی مدت را نشان میداد. در بررسی دستگاه گوارش، خالی بودن معده و روده ها مشاهده گردید. لیکن در مواردی تجمع متراکم شن و ماسه در معده ماهیان ملاحظه گردید. کلیه ها در اکثر ماهیان رنگ پریده و بافت عضلانی بشدت تحلیل رفته بود. در مواردی که پرخونی و یا خونریزی در سطح بدن وجود داشت همین مسئله در سطح احشا داخلی نیز مشاهده گردید. (تصاویر شماره ۲۶ ، ۲۷ ،۲۸ و۲۹)

ب – در گروه دوم علایم با گروه اول تا حدودی متفاوت بود. در این دسته لاغری مفرط و تحلیل شدید عضلات مشاهده گردید بطوریکه سر بسیار بزرگ و بدن بسیار باریک بود. در این ماهیان دستگاه گوارش کاملا خالی از غذا بود و بدن آنها به شدت دچار پولک ریزی شده بود. در مواردی در این ماهیان انحراف ستون فقرات و نیز کدورت قرنیه مشاهده گردید. این گروه نیز بشدت بیحال بوده و در سطح آب شناور بودند(تصاویر شماره ۳۰ و ۳۱).

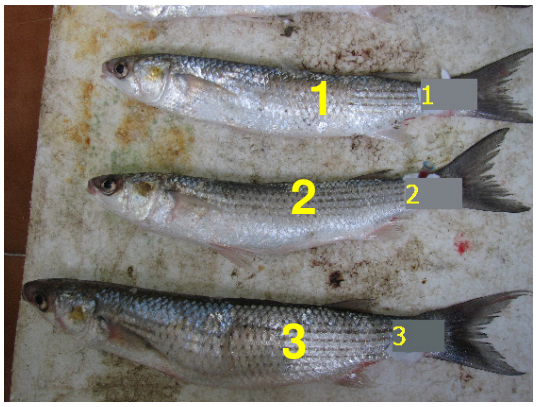
تصویر شماره ٢٦ : نمایی از ماهیان صید شده واجد علائم بالینی و رنگ پریدگی کبد



تصویر شماره ۲۷: نمایی از احشا داخلی، خالی بودن روده ها

تصویر شماره ۲۸: نمایی از
خونریزی سطحی در بدن

تصویر شماره ۲۹: نمایی از بیرون
زدگی چشم و خونریزی



تصویر شماره ۳۰: ماهی شماره ۳
واجد علایم بالینی

تصویر شماره ۳۱: مقایسه اندازه بین
ماهی سالم گروه اول و ماهیان
شماره ۱ و ۲ (ماهی شماره ۱) و
بیمار(ماهیان ۲،۳،٤) در گروه دوم
کفال ماهیان هم سن

نتایج حاصل از زیست سنجی و تعیین سن در ماهیان صید شده در تابستان ۸۶ و ماهیان بیمار و سالم صید شده در زمستان ۸۶ در جدول شماره ۶ آورده شده است.

جدول ٦ – نتایج حاصل از زیست سنجی ماهیان صید شده طی تابستان و زمستان ۱۳۸٦ و۱۳۸۹

نمونه / پارامتر	ماهیان مشکوک به بیماری صید شده در تابستان ۱۳۸٦ ۵۰ عدد	ماهیان بیمار صید شده در زمستان ۱۳۸٦ ۵۰ عدد	ماهیان سالم صید شده در زمستان ۱۳۸٦ ۵۰ عدد	ماهیان بیمار صید شده در زمستان ۱۳۸۹ ۵۰ عدد
متوسط طول (سانتیمتر)	۲۳/۲±۰/۳	۳۰/۶ ± ۰/۴	۳۲/۵ ± ۰/۵	۲۰/۴ ± ۰/۳
متوسط وزن (گرم)	۷۷/۳ ±۵/۳	۱۹۳/۱ ± ۱۰/۲	۲۳۳± ۱۱/۳	۶۱/۳ ± ۴/۵
متوسط سن (سال)	۱/۷۳ ± ۰/۱	۳/۷ ± ۰/۱	۳/۹ ± ۰/۱	۴ ±۰/۱

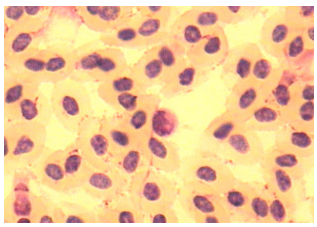
با توجه به نتایج حاصل از زیست سنجی و تعیین سن مشخص شد که ماهیان صید شده در تابستان از نظر وزن و طول تفاوت معنی داری با ماهیان سالم دارند که این مسئله با توجه به سن ماهیان فوق کاملا توجیه پذیر است. لیکن در ماهیان صید شده در زمستان علی رغم عدم تفاوت در سن ماهیان (تقریبا هم سن بودند)، تفاوت معنی داری در طول و وزن آنها وجود داشت و ماهیان بیمار در مقایسه با ماهیان سالم از وزن و طول کمتری برخوردار بودند. نکته قابل توجه کاهش شدید طول و وزن ماهیان مبتلا طی سال های اخیر می باشد. بر اساس گزارش بخش ارزیابی و ذخائر پژوهشکده اکولوژی دریای خزر در خصوص زیست سنجی کفال پوزه باریک طی سال های ۱۳۸۸-۱۳۸۳ متوسط طول و وزن ماهیان سالم چهار ساله به ترتیب ۲۷/۴ سانتیمتر و۲۱۳ گرم بوده است، این در حالی است که بر طبق اطلاعات جدید دریافتی از تلفات اخیر در زمستان ۱۳۸۹ در استان مازندران و زیست سنجی کفال ماهیان مبتلا، متوسط طول و وزن آنهابه ترتیب ۲۰/۴ سانتیمتر و ۶۱/۳ گرم بوده است.

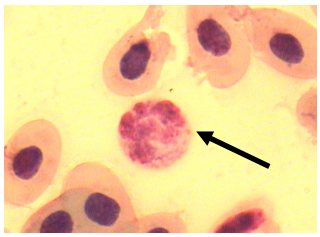
۲-۳- نتایج پارامترهای هماتولوژی و سرمی

به منظور تکمیل بررسی ها و با عنایت به اهمیت مطالعات خون شناسی در تشخیص اولیه بیماری ها ، این بررسی ها با هماهنگی مجری مسئول طرح ملی توسط همکاران بخش بهداشت و بیماری های آبزیان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (ساری) و تحت نظر مجری استانی صورت گرفت.

از نظر ظاهری در نمونه های خون بدست آمده از ماهیان صید شده در فصل تابستان ویژگی خاصی مشاهده نشد لیکن در ماهیان واجد علایم بالینی صید شده در زمستان در زمان بزل خون از ورید دمی، خون اخذ شده در بسیاری از موارد فاقد رنگ و غلظت معمولی در مقایسه با ماهیان سالم بود. در ماهیان بیمار خون بسیار کم رنگ(دامنه ای قرمز روشن تا صورتی تیره) و بسیار رقیق به نظر می آمد. اطلاعات مربوط به داده های هماتولوژی و آزمایشات سرمی در جدول ۷ و ۸ بطور خلاصه آورده شده است. از آنجایی که فاکتورهای هماتولوژی با سن و فصل تغییر میکند لذا در این بخش تنها به ذکر اطلاعات مربوط به ماهیان صید شده در

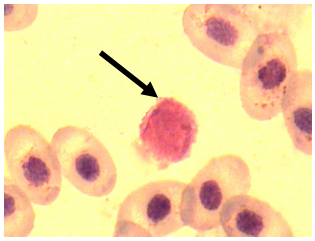
تابستان اکتفا شده است و داده های این ماهیان با ماهیان صید شده در زمستان مقایسه نگردیده است. لیکن در ماهیان صید شده در زمستان بررسی ها نشان داد که تعداد گلبولهای قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت و MCHC در ماهیان بیمار کاهش معنی داری در مقایسه با ماهیان سالم داشته است. لیکن میزان MCV در ماهیان بیمار بطور معنی داری بیشتر از ماهیان سالم بود و میزان MCH تفاوتی در دو گروه نداشت (تصاویر ۳۲ تا ۳۷).

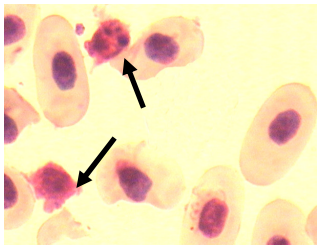

تصویر ۳۲

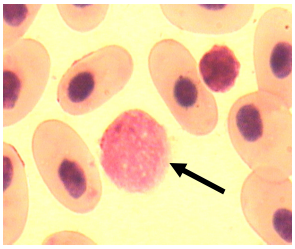

تصویر ۳۳

تصویر ۳۴

تصاویر ۳۲ تا ٣٤ : تصویر۳۲: نمایی کلی از گلبولهای قرمز، تصویر ۳۳: نوتروفیل(در محل پیکان)، تصویر٣٤: میلوسیت(درمحل پیکان)،


تصویر ۳۵


تصویر ۳۶


تصویر ۳۷

تصاویر ۳۵: لنفوسیت(در محل پیکان)، ۳٦ ترومبوسیت(در محل پیکان)، ۳۷ مونوسیت(در محل پیکان)

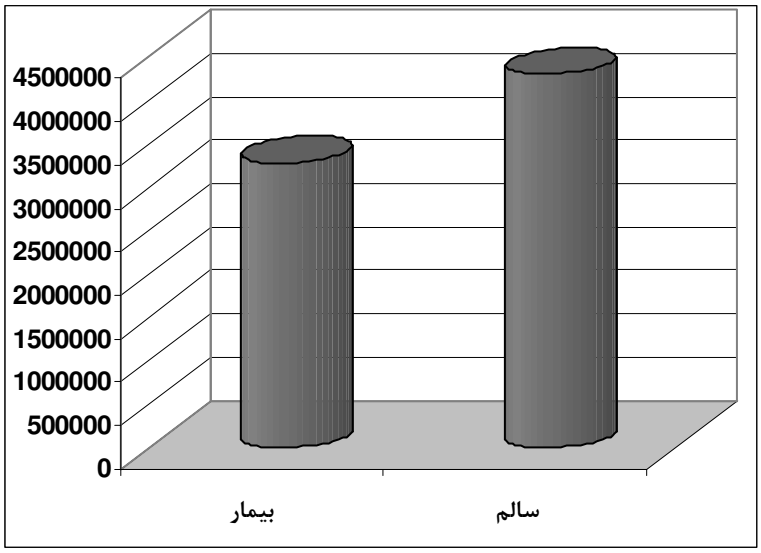
جدول۷- مقایسه میانگین فاکتورهای خونی ماهیان صید شده طی تابستان و زمستان ۱۳۸٦

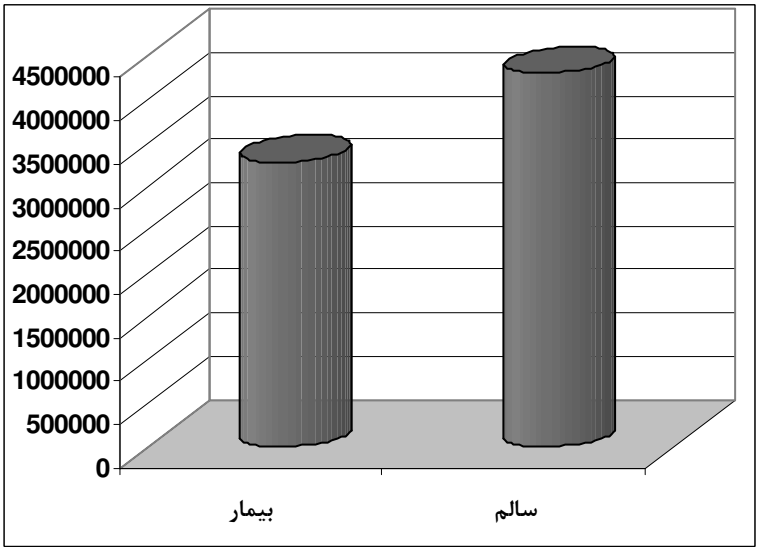
نمونه / پارامتر	ماهیان صید شده در تابستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)	ماهیان بیمار صید شده در زمستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)	ماهیان سالم صید شده در زمستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)
شمارش کلی گلبولهای قرمز(RBC)($N\times10^6$)	۲/۶ ± ۰/۱	۳/۳ ± ۰/۲	۴/۳ ± ۰/۱
هموگلوبین(Hb)	۷ ± ۰/۲	۱۰/۵ ± ۰/۶	۱۳/۵ ± ۰/۵
هماتوکریت(Hct)٪	۲۴/۳ ± ۰/۷	۳۴/۵± ۱/۷	۴۳/۶ ± ۱/۵
(MCH(pg)	۲۶ ± ۸	۳۱/۸ ± ۰/۴	۳۱ ± ۱
MCV(fL)	۹۲/۶± ۲/۹	۸۵/۱ ± ۵/۲	۵۹/۷ ± ۶/۶
MCHC	۲۸/۹ ± ۹	۲۹/۸ ± ۰/۲	۳۰/۸ ± ۸
شمارش کلی گلبولهای سفید(WBC)	۱۵۱۷۷/۴ ± ۶۵۱	۹۸۳۷/۵ ± ۵۳۴	۱۱۹۳۳/۳ ± ۵۱۵
لنفوسیت	۸۳/۳ ± ۱/۷	۶۱/۶ ± ۲/۵	۶۴/۵ ± ۱/۷
نوتروفیل	۱۰/۷ ± ۱/۴	۲۶/۳ ± ۱/۷	۲۸/۸ ± ۲/۱
مونوسیت	۰/۷ ± ۰/۱	۰/۸ ± ۰/۲	۰/۴ ± ۰/۲
میلوسیت	۵/۱ ± ۱	۱۱/۳ ± ۱/۶	۶/۵ ± ۰/۷

همچنین در ماهیان بیمار کاهش معنی داری درمیزان IgM تام، پروتیئن تام و آلبومین در مقایسه با ماهیان سالم مشاهده شد. لیکن مقادیر C3 و C4 علیرغم کاهش عددی در بیماران، از کاهش معنی داری برخوردار نبود. برخلاف این فاکتورها دو آنزیم ALT و AST افزایش معنی داری را در ماهیان بیمار نشان داد(نمودارهای ۳ تا ۱۳).

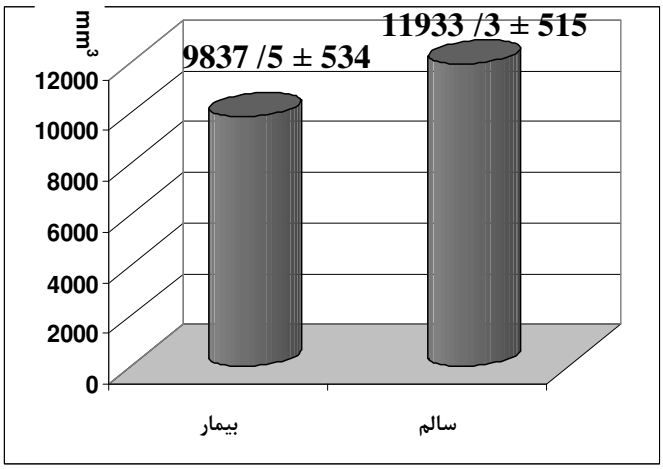
جدول۸ – مقایسه میانگین فاکتورهای سرمی ماهیان صید شده طی تابستان و زمستان ۱۳۸٦

نمونه / پارامتر	ماهیان صید شده در تابستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)	ماهیان بیمار صید شده در زمستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)	ماهیان سالم صید شده در زمستان ۱۳۸٦ (تعداد ۵۰)
پروتئین تام سرم(g/dL)	۲/۴ ± ۰/۱	۳/۴ ± ۰/۲	۴/۵ ± ۰/۲
آلبومین (mg/L)	۰/۸ ± ۰/۱	۲ ± ۰/۱	۲/۸ ± ۰/۲
IgMتام سرم(mg/L)	۵۴ ± ۴/۷	۹۰/۸ ± ۵/۴	۱۱۲/۴ ± ۷/۶
C3 (mg/L)	۲۷/۱ ± ۲/۳	۲۲/۶ ± ۱	۲۴/۲ ± ۱/۴
C4 (mg/L)	۵/۶ ± ۱	۱۴/۸ ± ۱/۷	۱۷/۵ ± ۳/۱
AST (U/L)	_____	۱۹۳ ± ۲۰/۳	۶۹/۵ ± ۸/۱
ALT (U/L)	_____	۱۶/۱ ± ۲	۳/۷ ± ۰/۳

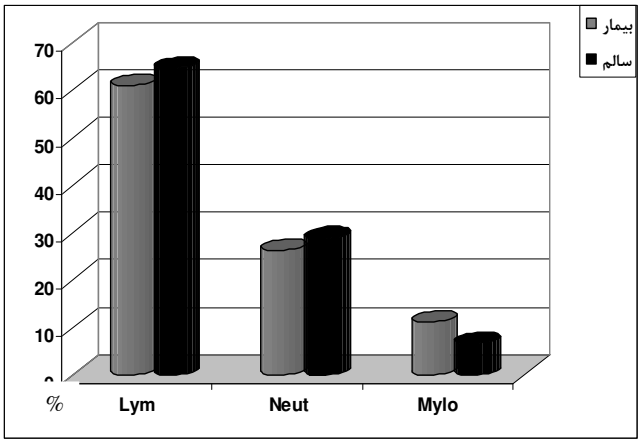




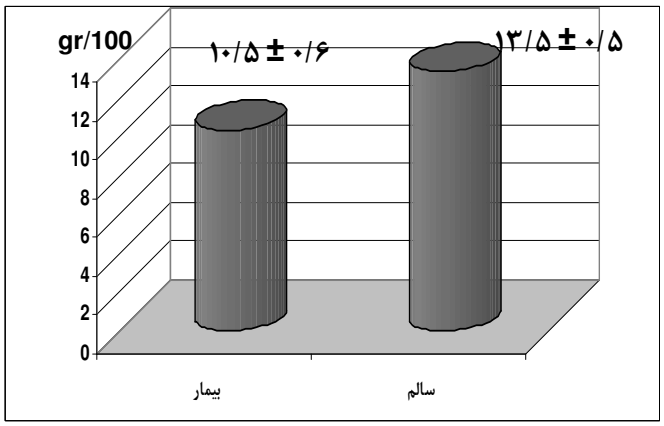
نمودار ۳– مقایسه میانگین تعداد گلبولهای قرمز در ماهیان سالم و بیمار



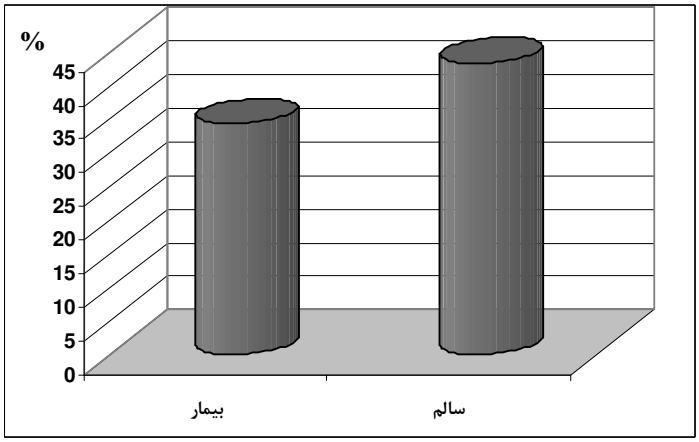
نمودار ٤ – مقایسه میانگین تعداد گلبولهای سفید در ماهیان سالم و بیمار



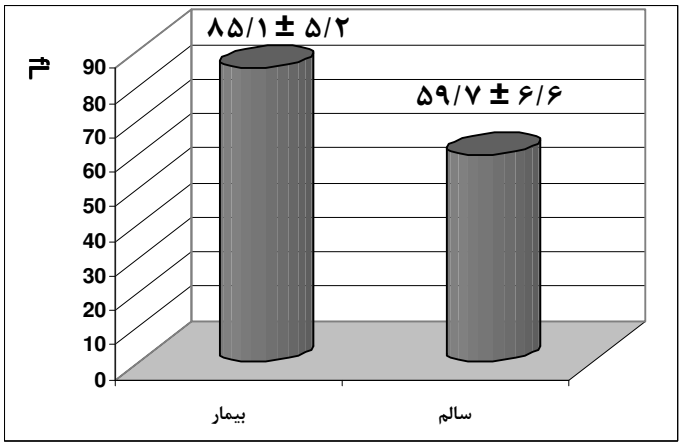
نمودار ٥ – مقایسه درصد انواع گلبولهای سفید در ماهیان سالم و بیمار
Mylo = **میلوسیت**، Neut = **نوتروفیل**، Lym = **لنفوسیت**



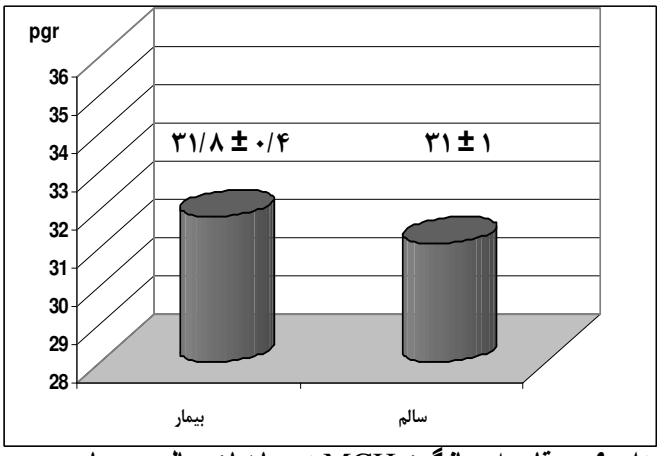
نمودار ٦ ـ مقایسه میانگین هموگلوبین در ماهیان سالم و بیمار



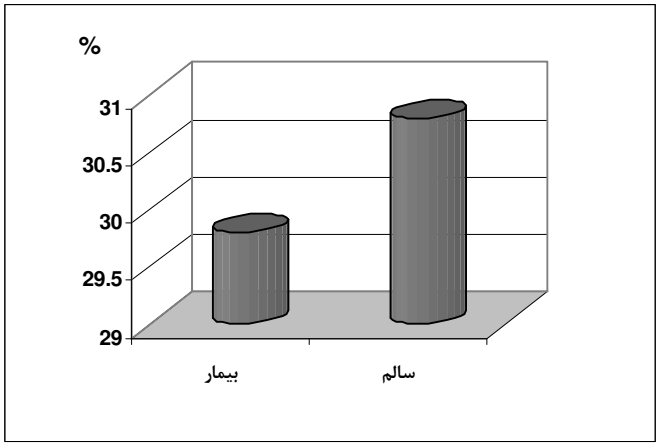
نمودار ۷ ـ مقایسه درصد هموتوکریت در ماهیان سالم و بیمار



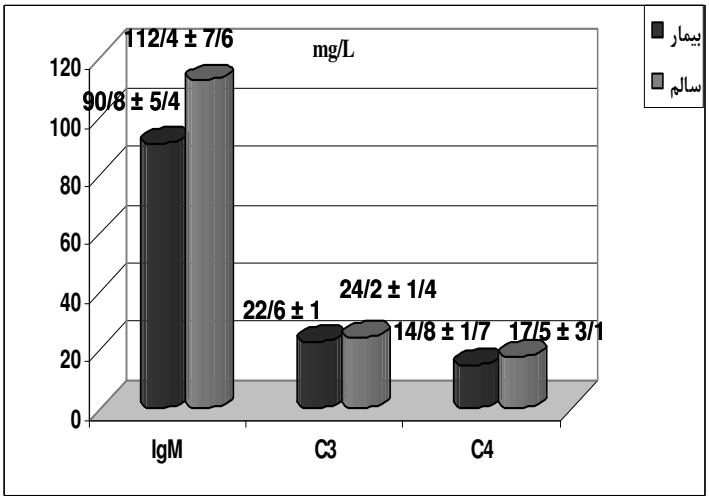
نمودار ۸ ـ مقایسه میانگین MCV در ماهیان سالم و بیمار



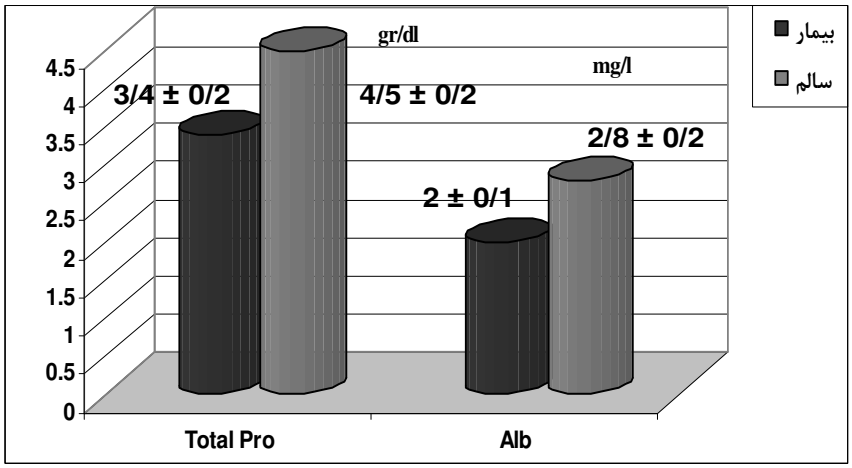
نمودار ۹ ـ مقایسه میانگین MCH در ماهیان سالم و بیمار



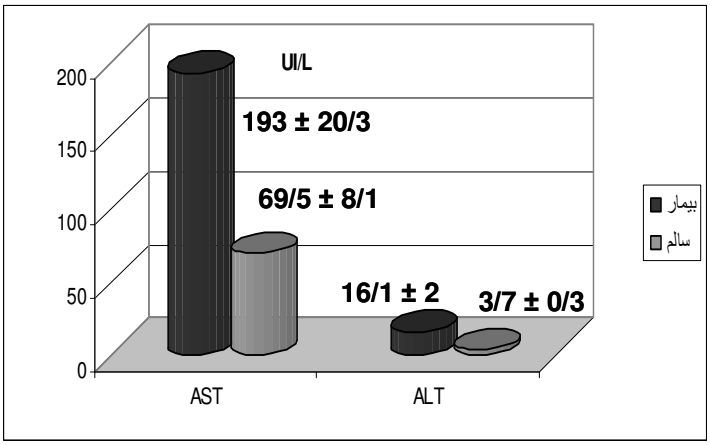
نمودار ۱۰- مقایسه میانگین MCHC در ماهیان سالم و بیمار



نمودار ۱۱ - مقایسه میانگین IgM، C3 و C4 در ماهیان سالم و بیمار



نمودار ۱۲- مقایسه میانگین پروتئین تام و آلبومین در ماهیان سالم و بیمار



نمودار ۱۳ – مقایسه میانگین آنزیمهای AST و ALT در ماهیان سالم و بیمار

۳ – ۳ – یافته های باکتری شناسی

در بررسی های باکتری شناسی از نمونه های صید شده در تابستان باکتری خاصی جدا نشد. لیکن در ۲۳ نمونه از ۵۶ عدد ماهی با علایم بالینی صید شده در زمستان کشت باکتریائی تهیه شده از بافتهای مغز و کلیه مثبت بود. از تمام نمونه های فوق کوکوباسیلهای گرم منفی، اکسیداز مثبت، تخمیر کننده ، با پرگنه های خاکستری رنگ، قوام خامه ای و رشد خزشی[۱] جدا شد که در روی محیط آگار خوندار همولیز آلفا ایجاد کردند. طی آزمایشات تفریقی که بر روی نمونه های میکروبی انجام شد باکتری جدا شده ویبریو آلجینولیتیکوس[۲] تشخیص داده شد

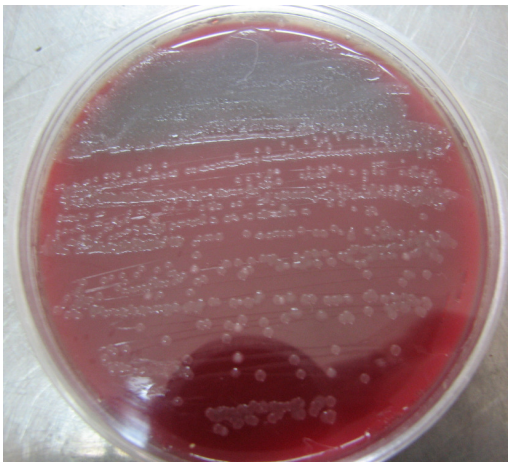
[۱] - Swarming
[۲] - *Vibrio alginolyticus*

که خصوصیات پرگنه و مورفولوژیک آن در تصاویر شماره ۳۸ و ۳۹ مشخص می باشد و نتایج آن به تفصیل در جدول شماره ۸ آورده شده است.

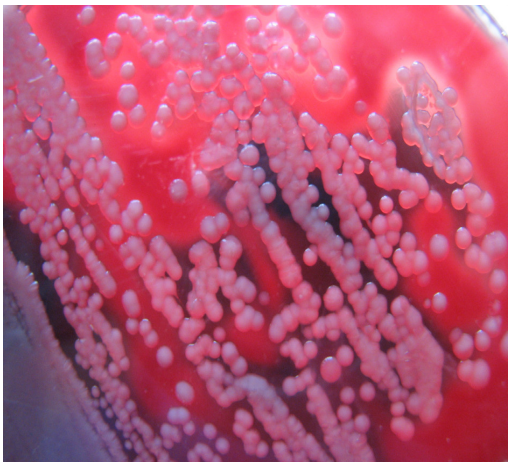
جدول شماره ۸ – خصوصیات باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس جداشده از مغز و کلیه ماهیان صید شده در زمستان ۸۶

باکتری / نوع ازمایش	ویبریو آلجینولیتیکوس (سلطانی و همکاران)	باکتری جداشده از مغز و کلیه ماهیان
حرکت	+	+
رشد ۴ درجه سانتیگراد	—	—
رشد در ۳۷ درجه سانتیگراد	+	+
رشد در نمک ۰٪	—	—
رشددرنمک ۳٪	+	+
رشد در نمک ۷٪	+	+
حساسیت به O/129دیسک ۱۰µg	R	R
رشد روی TCBS	Y	Y
بتاگالاکتوسیداز	—	—
آرژنین دهیدرولاز	—	—
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	+	+
مصرف سیترات	d	+
تولید سولفید	—	—
اوره آز	—	—
اندول	+	+
متیل رد	—	—
RM – VP	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+
تولید اسید از آرابینوز	—	—
گلوکز	+	+
اینوزیتول	—	—
مانیتول	+	+
سالیسین	—	—
سوربیتول	—	—
سوکرز	+	+

R = مقاوم Y= پرگنه زرد d= واکنش متغیر



تصویر شماره۳۸: نمای کلی از پرگنه جداشده از مغز محیط ماهیان کفال روی آگار خوندار



تصویر شماره ۳۹: نمایی از همولیز روی باکتری بر روی محیط آگار خوندار

٤-۳- یافته های آزمایشات فلزات سنگین

طی این آزمایشات میزان فلزات سنگین شامل سرب، روی، آهن، کبالت، کادمیم ، مس، کروم، منگنز، نیکل و جیوه در بخشهای مختلف بدن ۵۶ ماهی صید شده در استان مازندران، شامل عضلات، کبد و محتویات دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول شماره ۹ منعکس شده است.

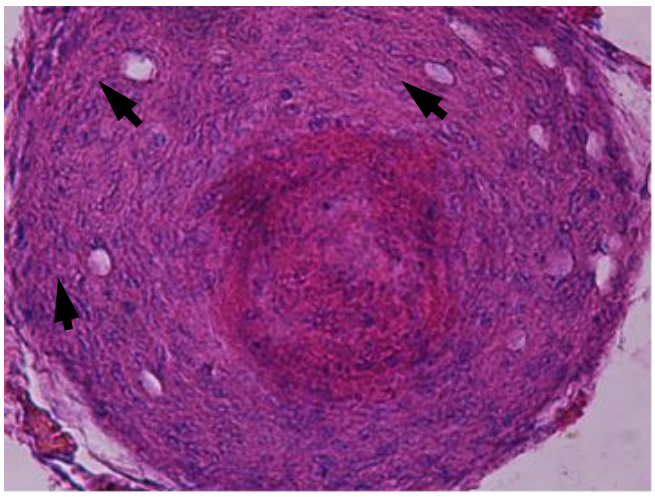
جدول شماره ۹ – نتایج حداقل و حداکثر مقادیر فلزات سنگین در بافتهای مختلف کفال ماهیان صید شده در زمستان ۱۳۸٦ (بر حسب ppm وزن خشک)

فلز / میزان	Hg	Ni	Mn	Cr	Cu	Cd	Co	Fe	Zn	Pb
حداقل	ND	ND	۱/۶۷	۰/۳۳	۰/۸۳	ND	ND	۶	۱۶	ND
حداکثر	۲/۵۴	۲۳/۶۷	۵۱۰	۱۸/۶۷	۳۴۶۵	۲۱/۱۶	۱۳	۳۸۳۴	۱۴۷	۱/۵
بافت	محتویات لوله گوارش	محتویات لوله گوارش	محتویات لوله گوارش	محتویات لوله گوارش	کبد	کبد	کبد	محتویات لوله گوارش	کبد	برانش و عضله

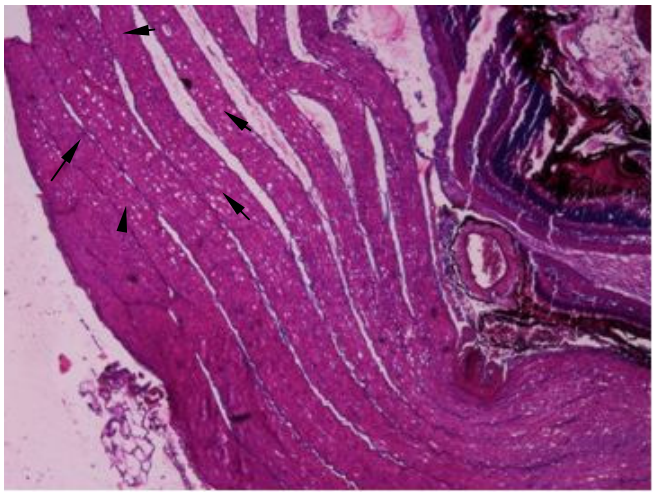
۵-۳- یافته های آسیب شناسی بافتی

مطالعات بافت شناسی حضور واکوئول در بافت مغز، نخاع، و عصب بینایی و شبکیه چشم ماهیان بیمار را نشان داد. گسترش واکوئول ها در بافت مغز و چشم متفاوت بوده و عمدتا در ماده خاکستری مغز و نخاع هستند و در برخی از ماهیان ، عصب بینایی واکوئولاسیون واضح نشان می دهد وبروز واکوئول ها در شبکیه چشم نیز واضح است (تصاویر ۴۰ الی ۴۳).

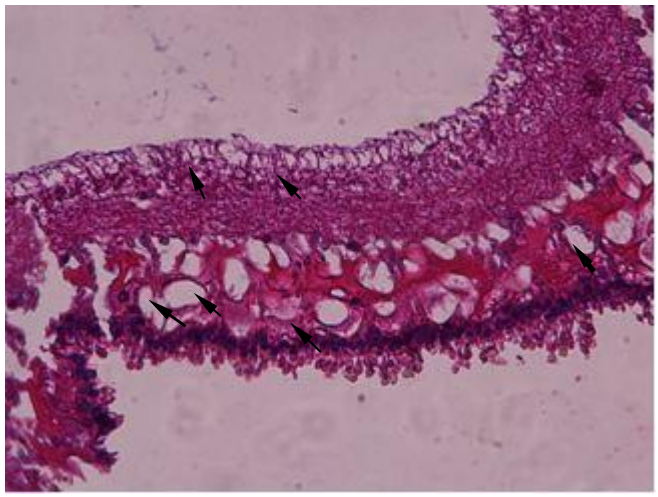
از سوی دیگر در بررسی های انجام شده بر روی ماهیان خاویاری در بررسی مقاطع بافتی مغز و شبکیه چشم ماهیان هیچگونه علامتی از حضور واکوئول مشاهده نشد. (تصاویر ۴۴ و ۴۵)



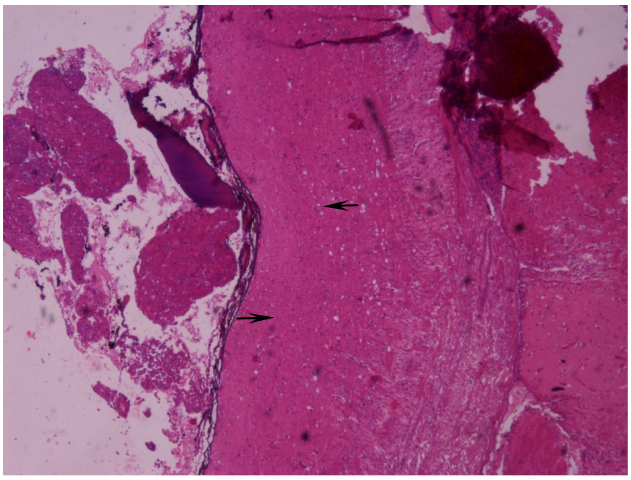
تصویر شماره ٤٠: واکوئولاسیون واضح در مقطع نخاع ماهی *L. auratus* (پیکان ها) (H&E x10)



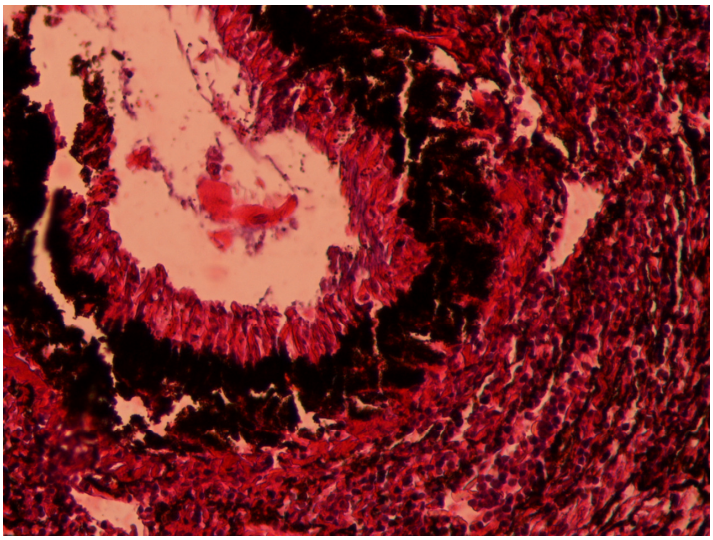
تصویر شماره ٤١: مقطع بافت عصب بینایی ماهی *L. auratus* دارای واکوئولاسیون گسترده (پیکان ها) (H&E, x4)



تصویر شماره ٤٢ : مقطع بافت چشم ماهی *L. auratus* مبتلا دارای واکوئولهای فراوان در شبکیه (پیکان ها) (H&E x4)

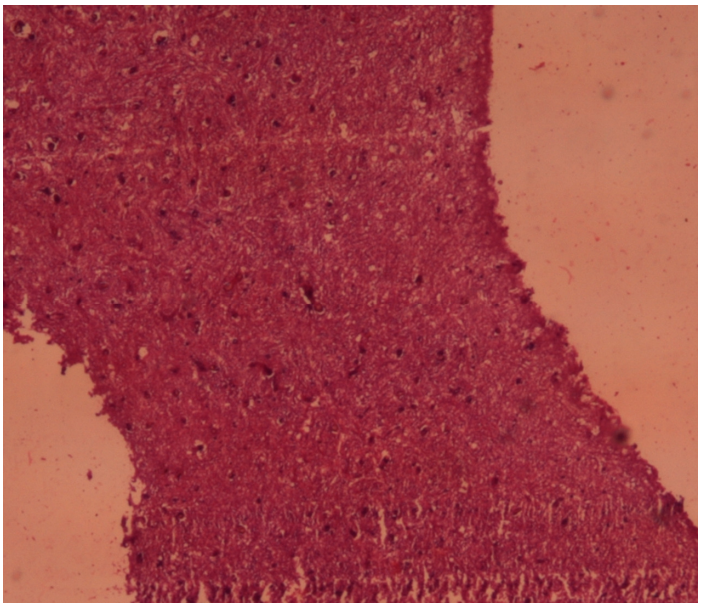


تصویر شماره ٤٣: بزرگنمایی کم مقطع بافت مغز *L. auratus* دارای واکوئول (پیکان) (H&E, x4)



تصویر شماره ٤٤: مقطع بافت چشم تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) بدون حضور واکوئول در شبکیه

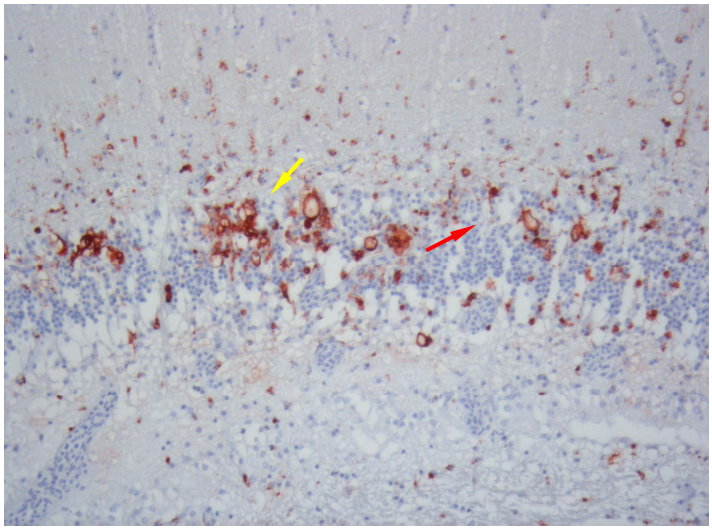
(H&E, x4)



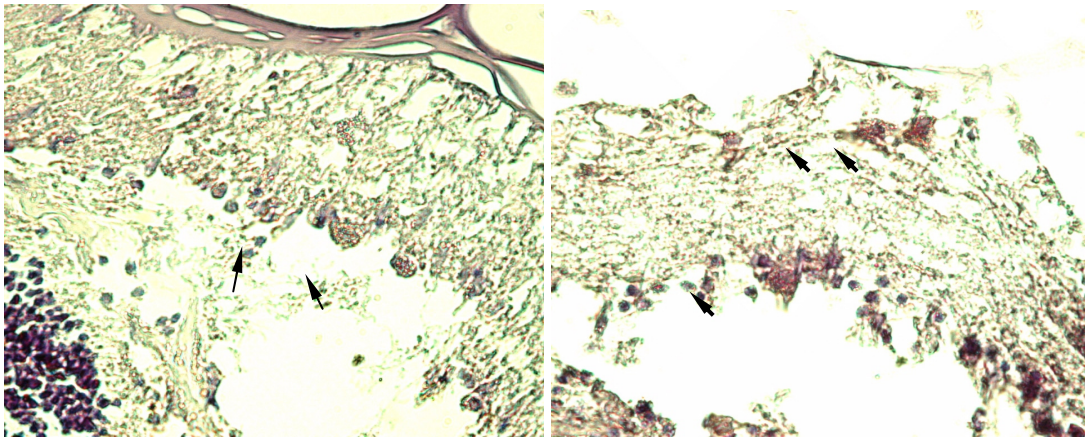
تصویر شماره ٤٥: مقطع مغز تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) بدون واکوئول (H&E, x4)

٦-٣- نتایج آزمایش ایمونوهیستوشیمی

حضور رنگدانه های قرمز- قهوه ای در مقطع بافتهای آزمایش شده در آزمایش ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده حضور آنتی ژن بتانوداویروس بود که به دلیل واکنش غیر مستقیم با ماده رنگی DAB ، این رنگ در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده می گردد.(تصاویر ۴۶ و ۴۷).



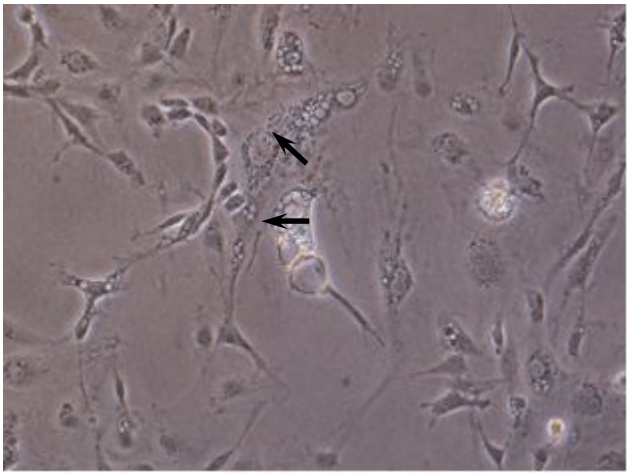
تصویر شماره ٤٦: مقطع بافت مغز ماهی که در آزمایش ایمونوهیستوشیمی، رنگدانه های قرمز- قهوه ای را در واکوئول های موجود در ماده گرانولار نشان می دهد.(پیکان ها)(H&E, 40X)
(تصویر نمونه کنترل مثبت دریافتی از Prof.G.Bovo)



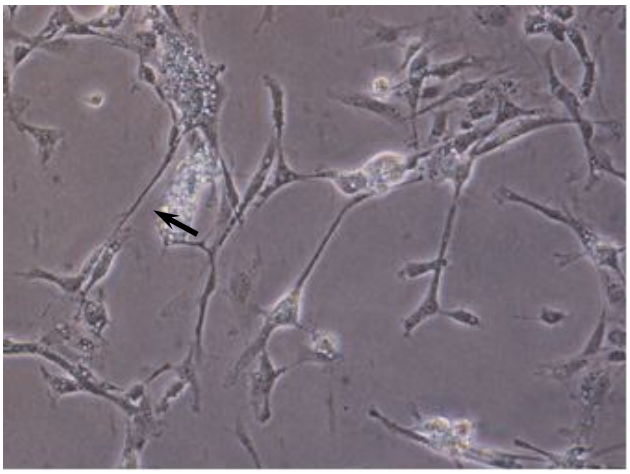
تصویر شماره ٤٧: مقطع بافت شبکیه چشم ماهی *L.auratus* که در آزمایش ایمونوهیستوشیمی، رنگدانه های قرمز-قهوه ای را در واکوئول های موجود در شبکیه چشم نشان می دهد.(پیکان)(H&E,40X)

۷-۳- نتایج کشت سلول

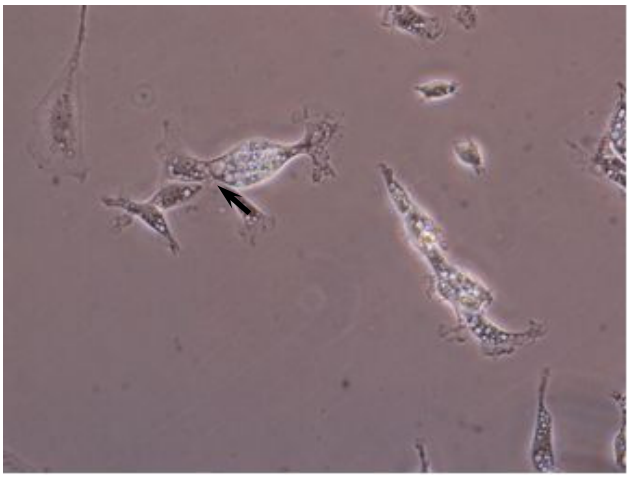
آثار آسیب سلولی(CPE) در SSN-1 به کندی رخ می دهد. و در تحقیق حاضر ، ۶ روز پس از تلقیح هموژن فیلتر شده بافت های مغز و چشم ماهیان کفال بیمار به تک لایه سلولی اولین آثار آسیب سلولی CPE به صورت گرد، دانه دار و واکوئوله شدن سیتوپلاسم سلولها دیده شد که ابتدا در یک یا چند نقطه ایجاد شده و کم کم به تمام لایه سلولی توسعه پیدا کرد. میزان CPE در سه پاساژ بعدی افزایش پیدا کرد. تیتر ویروس نیز $TCID_{50}$ مساوی با 10^4 به ازای هر میلی لیتر محاسبه شد.(تصاویرشماره ۴۸ الی ۵۱)



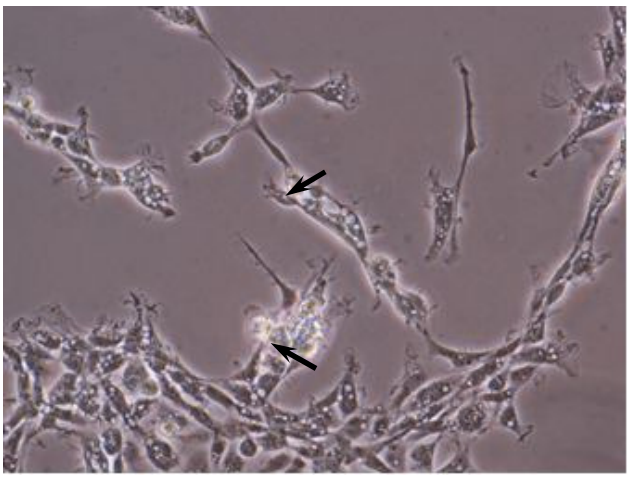
تصویر شماره ٤٨: واکوئولاسیون ایجاد شده در سیتوپلاسم سلولهای SSN-1 ، ٦ روز پس از تلقیح هموژن فیلتر شده بافت مغز و چشم ماهیان کفال طلایی(*L.auratus*) بیمار (20X)



تصویر شماره ٤٩: واکوئولاسیون در سلولهای SSN-1 ، ۷ روز بعد ازتلقیح هموژن فیلتر شده بافت مغز و چشم ماهیان کفال طلایی(*L.auratus*) بیمار (20X)

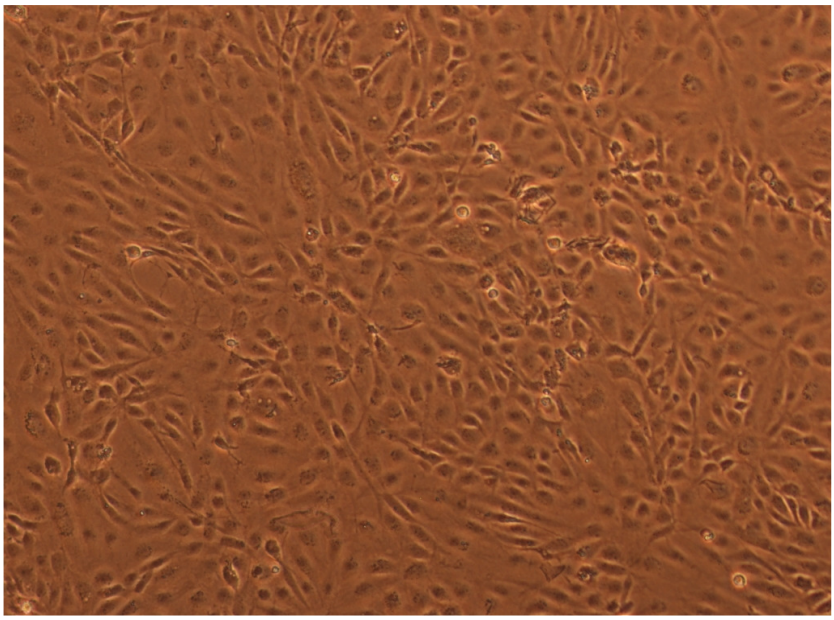


تصویر شماره ۵۰: واکوئولاسیون در سلولهای SSN-1 ، ۵ روز بعد ازاولین پاساژ از سوپرناتانت سلولهای SSN-1 آلوده شده(20X)



تصویر شماره ۵۱: واکوئولاسیون در سلولهای SSN-1 ، ۵ روز بعد ازدومین پاساژ از سوپرناتانت سلولهای SSN-1 آلوده شده(20X)

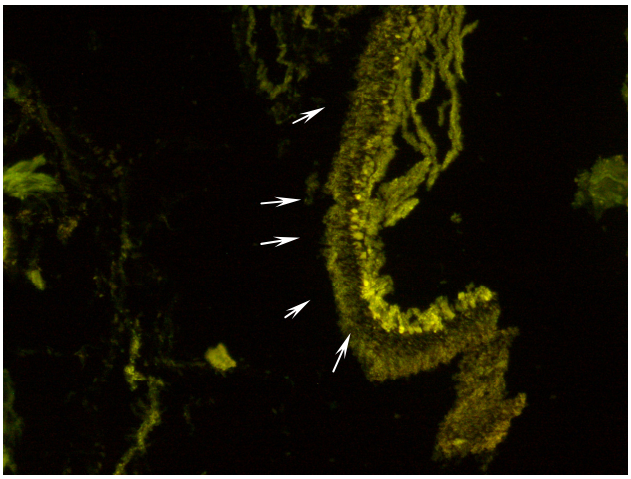
از سوی دیگر جهت بررسی احتمال حضور عامل بتانوداویروس در مولدین خاویاری، نمونه های مغز وچشم تاس ماهی ایرانی دربخش بیماریهای پژوهشکده آبزی پروری، هموژن شده وسوپر ناتانت آن پس ازعبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرون برروی سلول SSN-1 تلقیح گردید و طبق گزارش بخش بیماریهای آن پژوهشکده هیچ گونه CPE در سلول دیده نشد و لذا نتایج کشت سلول در مولدین خاویاری منفی گزارش گردید(تصویر ۵۲) .



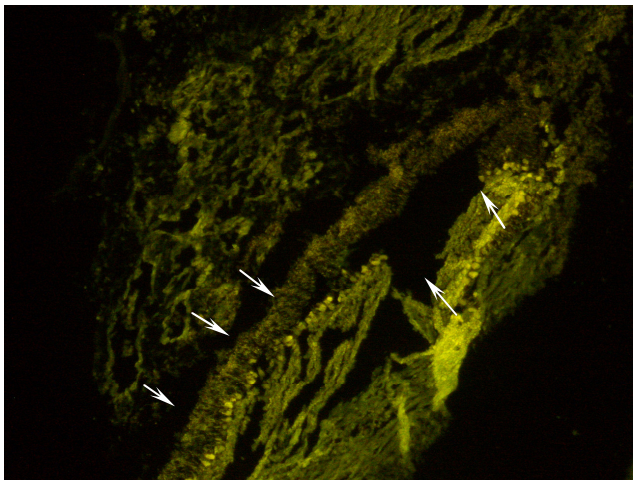
تصویر شماره ۵۲: سلول SSN-1 تلقیح شده با نمونه چشم و مغز تاس ماهیان ایرانی مورد مطالعه بدون آثارCPE

۸-۳- نتایج آزمایش پادتن های درخشان به روش غیر مستقیم

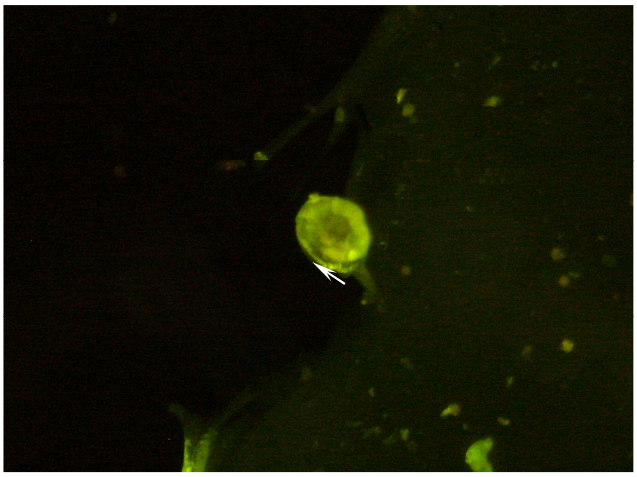
در آزمایش ایمونوفلورسنت انجام شده بر روی مقاطع بافتی، نقاط براق فلورسنت در مقطع شبکیه چشم ماهیان بیمارمشاهده شد. همچنین آنتی ژن های ویروسی در سلولهای SSN-1 آلوده، ۷ روز پس از تلقیح هموژن فیلتر شده بافت مغز و چشم آلوده مشاهده گردید.(تصاویر ۵۳ الی ۵۶ در مقایسه با نمونه کنترل منفی، تصویرشماره ۵۷).



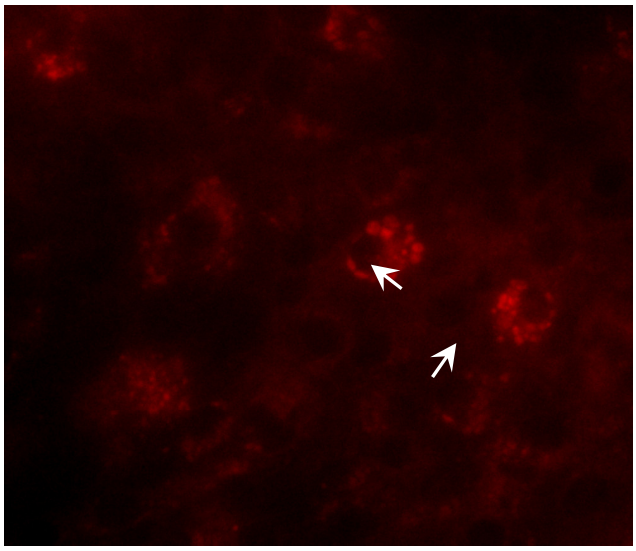
تصویر شماره ۵۳: نقاط طلایی براق(پیکان ها) درمقطع شبکیه چشم ماهی کفال طلایی(*L. auratus*) آلوده به بتا نوداویروس در آزمایش ایمونوفلورسنت (IFAT,4X)



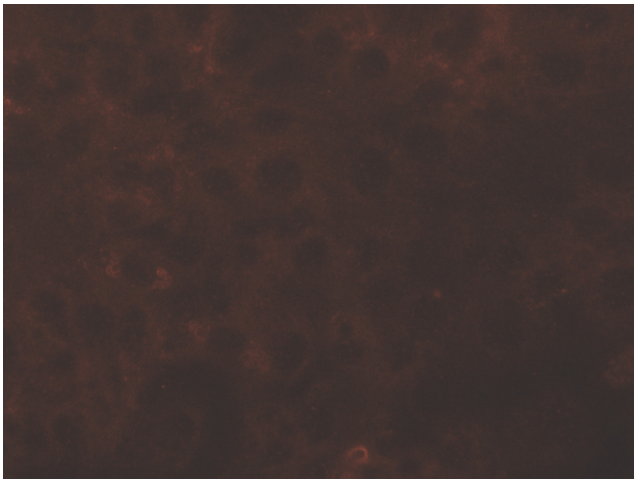
تصویر شماره ٥٤: آزمایش ایمونوفلورسنت بر روی مقاطع شبکیه چشم ماهی کفال طلایی(*L.auratus*) وجود آنتی ژن های نوداویروس را نشان داد.(پیکان) (4X)



تصویر شماره ۵۵: آزمایش ایمونوفلورسنت بر روی سلول SSN-1 آلوده شده با هموژن بافتی ماهی کفال طلایی (*L.auratus*)، ٦ روز پس از تلقیح، نقاط طلایی براق را در داخل سیتوپلاسم سلولهای آلوده نشان می دهد.(پیکان) (40X)



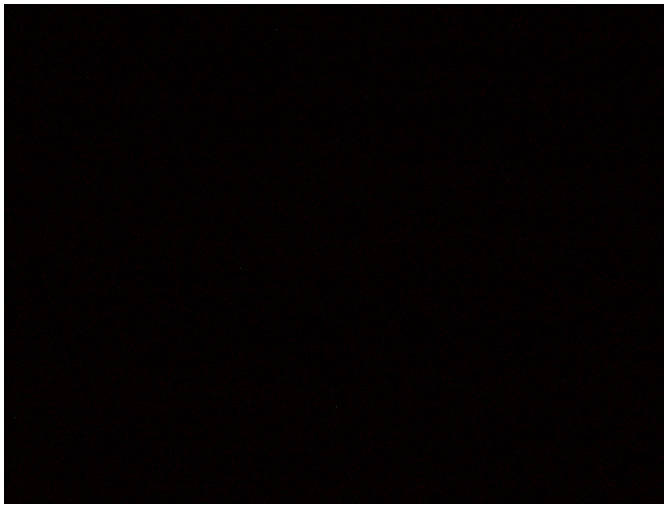
تصویر شماره ٥٦: آزمایش ایمونوفلورسنت بر روی سلول SSN-1 آلوده شده با هموژن بافتی ماهی کفال طلایی (*L.auratus*) نقاط نارنجی براق را در داخل سیتوپلاسم سلولهای آلوده نشان می دهد.(پیکان) (60X)



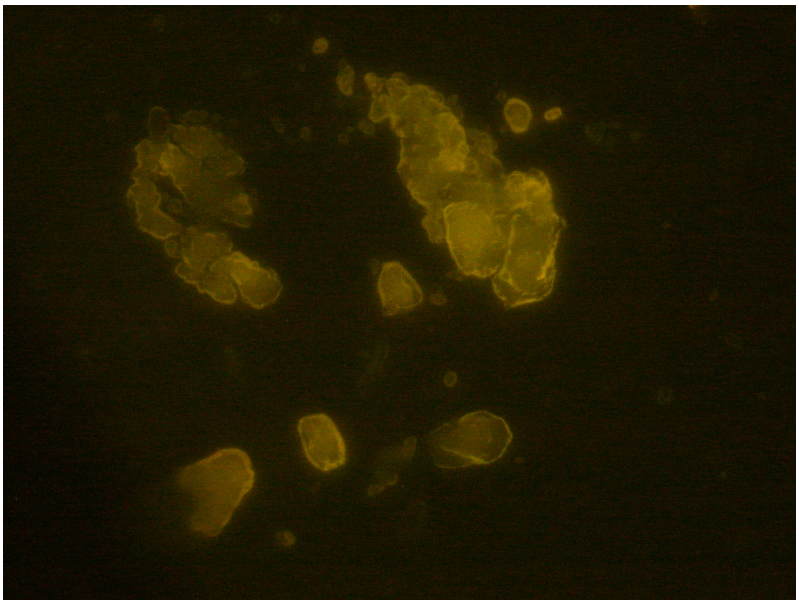
تصویر شماره ۵۷: کنترل منفی درآزمایش ایمونوفلورسنت بر روی سلول SSN-1 (X40)

در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان(رشت) نتایج حاصله در آزمایش ایمونوفلورسنت انجام شده بر روی مقاطع بافتی به شرح ذیل بود:

درآزمایش ایمونوفلورسنت که بر روی آثار بافتی تثبیت شده بر روی لام شیشه ای در مقایسه با نمونه های مثبت حاصل از کفال ماهیان انجام شد، نقاط براق درخشان که نشانه حضور آنتی ژن ویروسی است در نمونه های ماهیان خاویاری مشاهده نشد (تصاویر شماره ۵۸ و ۵۹).



تصویر شماره ۵۸: نمونه منفی بر روی مولدین تاس ماهی در آزمایش IFAT



تصویر شماره ۵۹: کنترل مثبت در آزمایش IFAT
(جدا شده از ماهی کفال طلایی در پژوهشکده آبزی پروری)

۹-۳- نتایج آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز Nested-Rt-PCR :

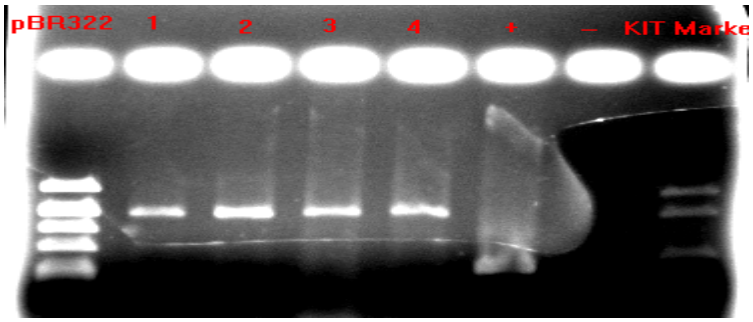
آزمایشات مولکولی با استفاده ازکیت IQ2000 ™ که حاوی کیت استخراج RNA و همچنین کیت RT – PCR به همراه کنترل مثبت و منفی بود و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در هر سه مرکز تحقیقاتی شمال ایران شامل پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری)، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی) و انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) به مرحله اجرا درآمد و نتایج ذیل حاصل شد:

الف) پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری):

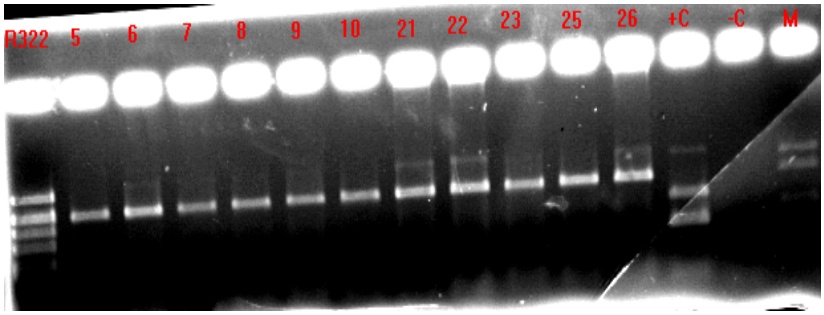
در نمونه های تهیه شده از مغز ماهیان صید شده در تابستان، در کلیه نمونه های فوق پس از آماده سازی و انجام آزمایش PCR بر اساس دستورالعمل کیت هیچگونه باند اختصاصی که دلالت بر آلودگیهای ماهیان فوق داشته باشد مشاهده نشد. در نمونه های مغز بدست آمده در ماهیان بیمار صید شده در زمستان کلیه نمونه ها با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت اختصاصی مربوط به شناسایی ویروس VNN مورد استخراج RNA قرار گرفت و بر روی محصول بدست آمده ابتدا RT-PCR و بعد از آنNested PCR انجام شد.

بر اساس دستورالعمل کیت درکنترل مثبت(+C) سه باند مشاهده میشودکه دراندازه های ۲۸۹bp ، ۴۷۹ bp و ۱۱۶۰ bp می باشد. در نمونه هایی که فقط باند۲۸۹ bp مشاهده شود عفونت خفیف، در نمونه هایی که دو باند ۲۸۹bp و ۴۷۹ bp عفونت متوسط و در نمونه هایی که هر سه باند مشاهده شود نشانه عفونت شدید به ویروس است. لیکن اگر در نمونه فقط باند ۶۶۵ bp مشاهده شود نمونه از نظر وجود ویروس منفی است.

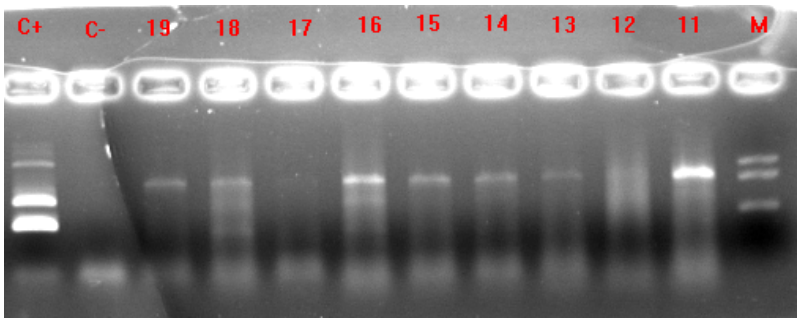
با انجام آزمایش بر روی ۵۶ نمونه مغز ماهیان دارای علایم بالینی، در تمام نمونه ها باند ۶۶۵bp مشاهده شد لیکن در دو نمونه ۱۶ و ۱۸ علاوه بر این باند هاله ای از وجود دو باند ۲۸۹bp و ۴۷۹ bp مشاهده شد که جهت تایید مجددا بر روی آنها آزمایش صورت گرفت که در آزمایش مجدد، فقط باند ۶۶۵ bp مشاهده گردید. لذابر روی نمونه های این پژوهشکده نتیجه منفی اعلام می گردد. نتایج حاصل از PCR نمونه ها طی تصاویر ۶۶ – ۶۰ ارائه شده است آمده است .



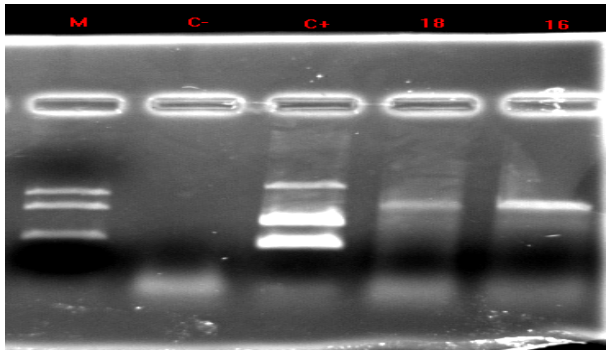
تصویرشماره ۶۰: RT-PCR نمونه های پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر



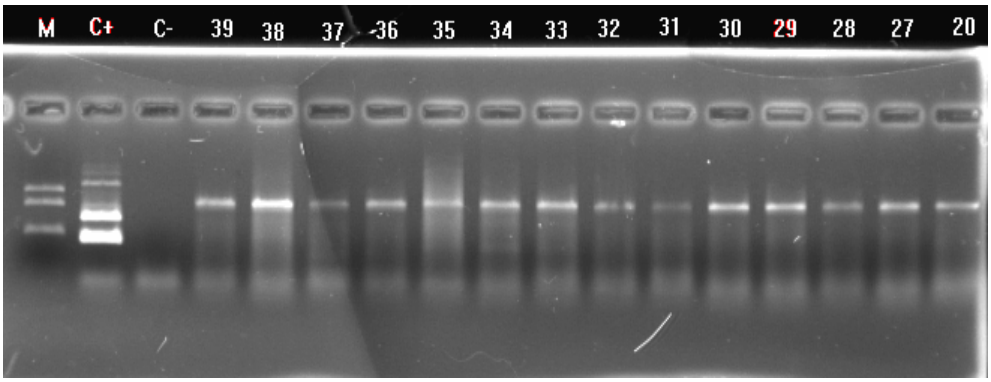
تصویر شماره ۶۱: RT-PCR نمونه های پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر



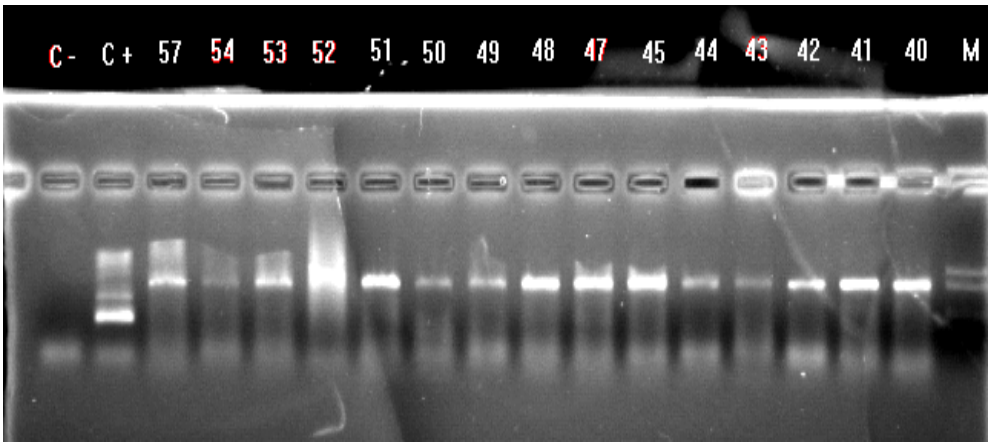
تصویر شماره ٦٢: مشاهده هاله ای از دوباند ۲۸۹ و bp ٤٧٩ در نمونه های ١٦ و ١٨



تصویر شماره ٦٣: نمایی از محصول PCR دو نمونه ١٦ و ١٨ در آزمایش مجدد

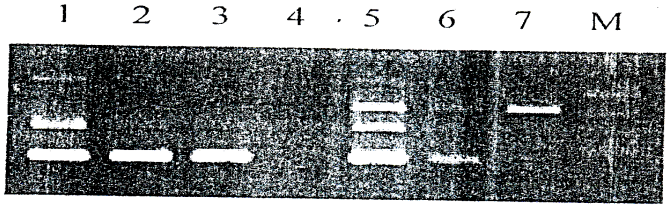


تصویر شماره ٦٤: نمایی از محصول PCR



تصویر شماره ٦٥: نمایی از محصول PCR

1. Positive samples and standards will show the following patterns on gel:



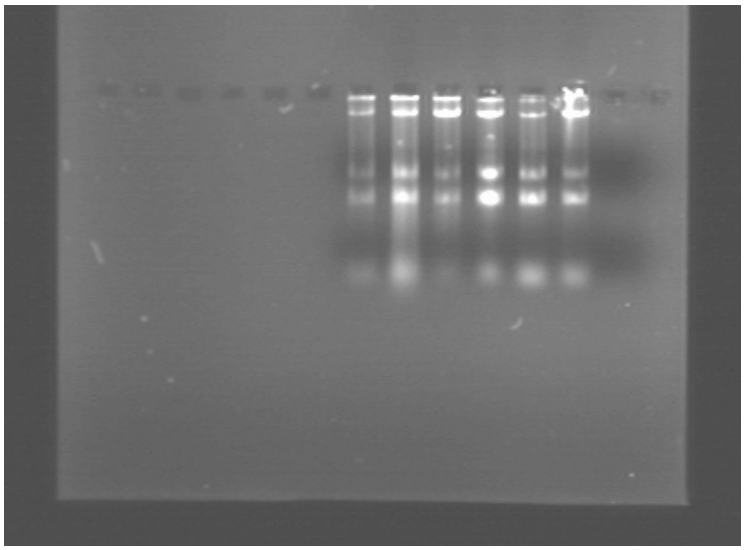
Lane 1: standard 1, 2000 copies/reaction
Lane 2: standard 2, 200 copies/reaction
Lane 3: standard 3, 20 copies/reaction
Lane 4: ddH_2O
Lane 5: sample of severe VNN infection
Lane 6: sample of light VNN infection
Lane 7: VNN negative sample
Lane M: molecular weight marker, 848 bp, 630 bp, 333 bp

2. Diagnostic procedure:
   a. band formed at 289 bp only: light P(+)
   b. band formed at 289 and 479 bp: medium P(+)
   c. band formed at 289, 479, and 1160 bp: severe P(+)
   d. band only formed at 665 bp: VNN negative N(-)

تصویر شماره ٦٦: راهنمای کیت جهت چگونگی استنتاج نتایج

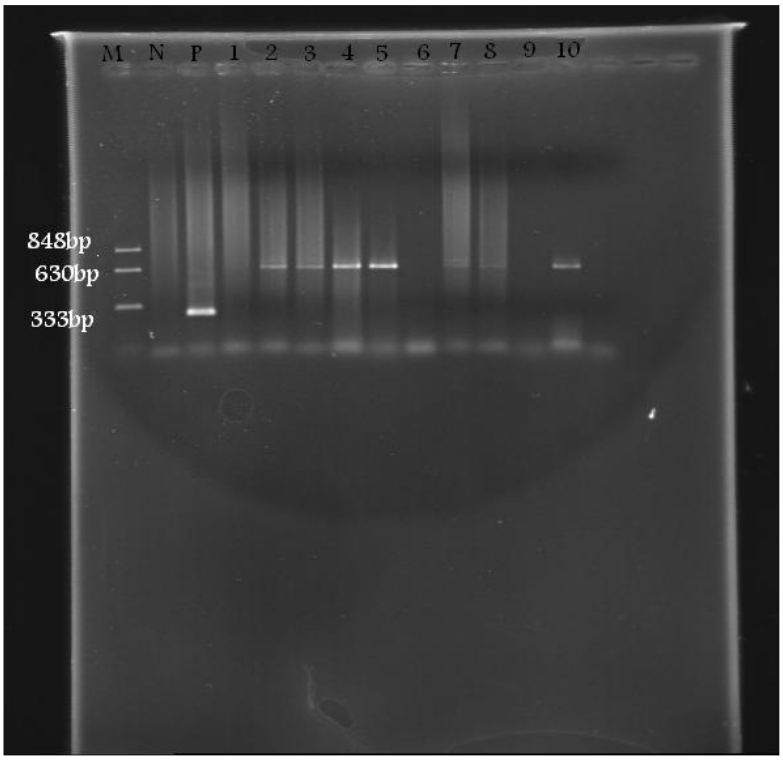
ب) انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت):

استخراج RNA با استفاده از کیت IQ2000 از چشم و مغز ۲۷ مولد ماده و ۱۵ مولد نرتاس ماهی ایرانی انجام شد و کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۲درصد صورت گرفت که ۳ باند ۵ ، ۱۸ و ۲۵ bp مشاهده گردید که نشانه استخراج مناسب RNA بود (تصاویر ۶۷ و ۶۸).



تصویر شماره ٦٧: باندهای RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد

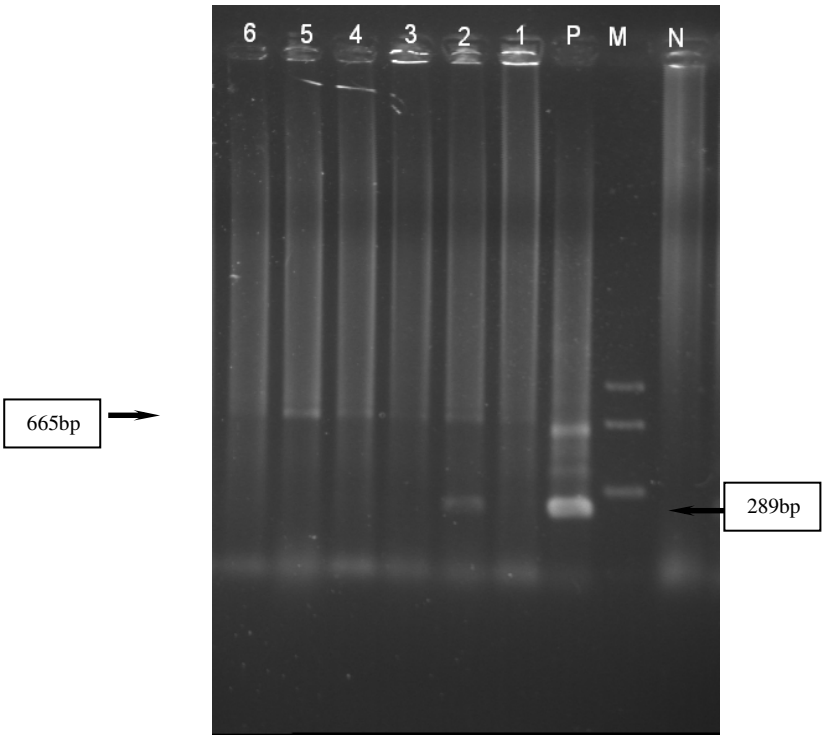
بر اساس دستورالعمل کیت، مشاهده باند ۶۶۵ bp در بررسی نتایج الکتروفورز محصول Nested RT-PCR حاکی از عدم وجود نوداویروس در نمونه های تاس ماهی ایرانی مورد مطالعه بود .



تصویر شماره٦٨: نتایج Nested-PCR **نمونه های مغز و چشم تاسماهی ایرانی**
از چپ به راست: مارکر (bp ٨٤٨ ، bp ٦٣٠ **و** bp ٣٣٣) ، **کنترل منفی، کنترل مثبت** bp ٢٨٩ ، ١٠ **نمونه منفی** (bp ٦٦٥)

ج) پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی):

این آزمایش در دو مرحله انجام شد. مرحله اول بر روی اسید نوکلئیک استخراج شده از نمونه های بافتی مغز و چشم ماهیان کفال دارای علایم بالینی صید شده از پره های صیادی استانهای گیلان و مازندران و در مرحله دوم بر روی سلولهای SSN-1 تلقیح شده با هموژن بافتی ماهیان بیمارانجام گرفت. نتایج بر اساس دستورالعمل کیت IQ2000 حاکی از وجود RNA بتانوداویروس در بافت مغز و چشم ماهیان و همچنین در سوپرناتانت سلولهای SSN-1 دارای CPE بود به این ترتیب که مشاهده باندهای bp ۲۸۹ و bp ۴۷۹ در بیماری با حدت متوسط و باندهای bp ۲۸۹ و bp ۶۶۵ در حدت خفیف بیماری مشاهده شد و در نمونه های منفی نیز باند bp ۶۶۵ به تنهایی دیده شد(تصاویر ۶۹ و ۷۰).

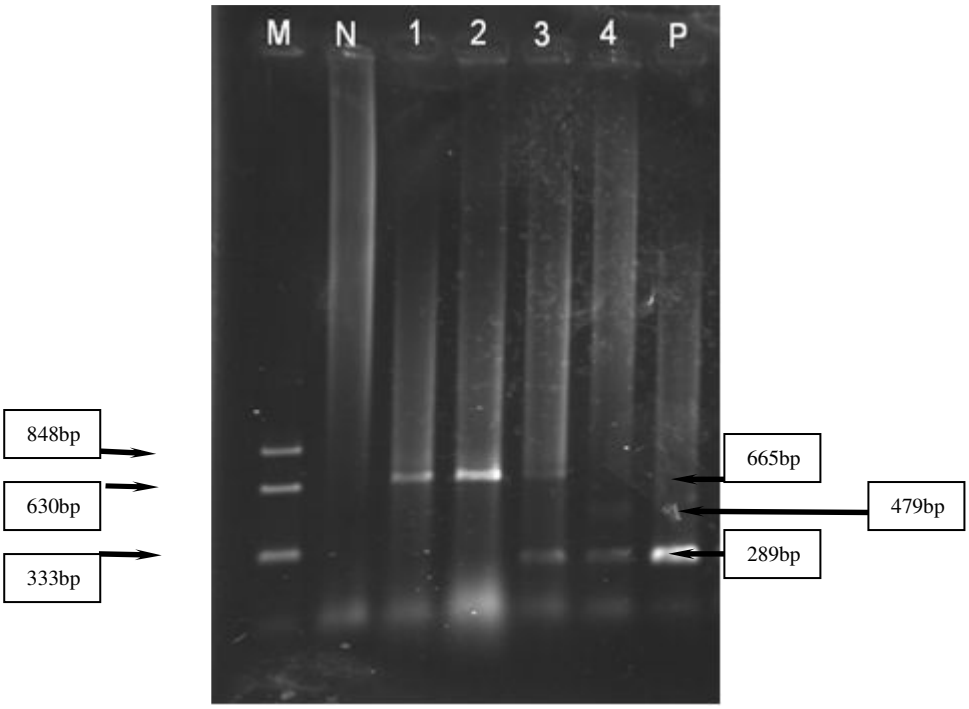


تصویر شماره ٦٩: الکتروفورز محصول Nested-RT-PCR
حاصل از نمونه مثبت بدست آمده از عفونت طبیعی

باند 289bp برای نمونه های مثبت(با استفاده از کیت تشخیص VNN محصول شرکت IQ2000 ™)

M: نشانگر وزن مولکولی
N: کنترل منفی
P: کنترل مثبت
1: نمونه مغزشماره یک
2: نمونه چشم شماره یک
3: نمونه مغزشماره دو
4: نمونه چشم شماره دو
5: نمونه مغزشماره سه
6: نمونه چشم شماره سه

در این شرکت نمونه cDNA مورد نظر از ماهیان مبتلای طبیعی تهیه شده است.



تصویر شماره ۷۰: الکتروفورز محصول Nested-RT-PCR **حاصل از سلولهای** SSN-1 **دارای** CPE **باند** 289bp **برای نمونه های مثبت (با استفاده از کیت تشخیص** VNN **محصول شرکت** IQ2000 ™)

M: **نشانگر وزن مولکولی**

N: **کنترل منفی**

P: **کنترل مثبت**

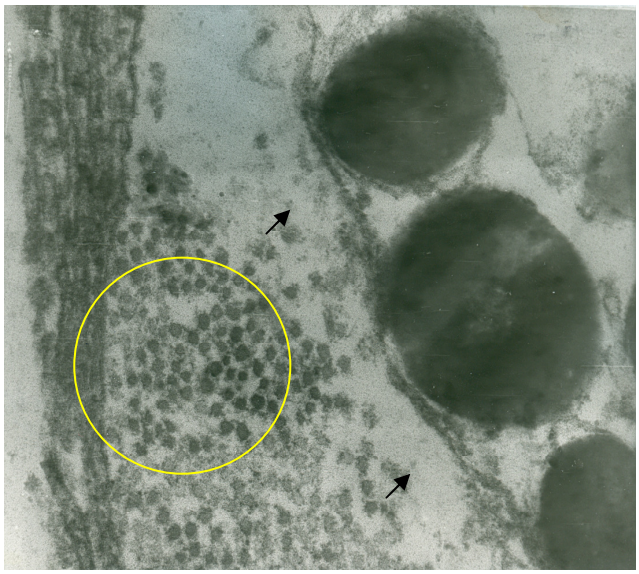
1&2: **تیره سلولی** SSN-1 **غیرآلوده که باند** 665bp **را نشان می دهد**

3: **تیره سلولی** SSN-1 **آلوده که باند** 289bp **و** 665bp **را نشان می دهد**

4: **تیره سلولی** SSN-1 **آلوده که باند** 289bp **و** 479bp **را نشان می دهد**

۱۰-۳- نتایج میکروسکوپ الکترونی

در مقاطع بسیار نازک بافتی در زیر میکروسکوپ الکترونی ذرات ویروسی با آرایش منظم و متمرکز در داخل دیواره واکوئول مشاهده شد. اندازه تقریبی ذرات ویروسی مذکور۳۰-۲۵ nm اندازه گیری شد(شکل ۷۱).



تصویر شماره ۷۱: تصویر ذرات بتانوداویروس به طور متراکم و دارای آرایش منظم در شبکیه چشم ماهی کفال طلایی دریای خزر(*L.auratus*) که در سطوح مختلفی مقطع خورده اند. دیواره کپسول حاوی ویروسها مشخص است (پیکان) (بزرگنمایی با میکروسکوپ الکترونی ۷۶۵۰X)

۱۱-۳- نتایج مواجهه سازی(Challenge)

۱-۱۱-۳- مواجهه سازی در ماهیان گوپی

بعد از گذشت ۱۵ روز اولین علائم بالینی بیماری در ماهی ها مشاهده شد. پس از بروز علائم بالینی تلفات نیز در جمعیت های هر دو تیمار آغاز وتا ۷۵ روز بعد از اولین تلفات ادامه داشت.

علائم بالینی مشاهده شده عبارت بودند از بی اشتهایی، تیرگی بدن، بیرون زدگی چشم ها ، شنای غیر عادی، اتساع محوطه شکمی ،شنای Darting، Belly-up و خونریزی های زیر جلدی در ناحیه سر و دیگر مناطق بدن(تصویر ۷۲).

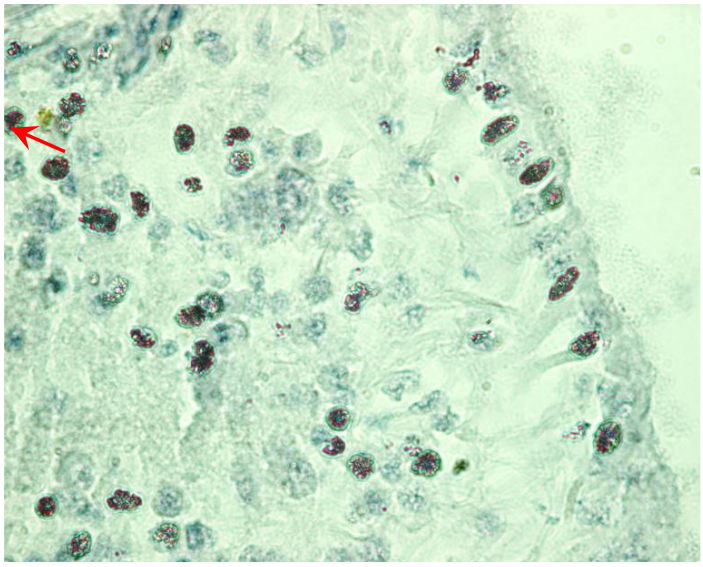
از ماهی های دارای علائم بالینی جهت بررسی های آسیب شناسی، ویروسی و سرولوژی نمونه برداری گردید.

بررسی های آسیب شناسی واکوئولاسیون شدید و واضح را در لایه گرانولار مغز و در شبکیه چشم به صورت کاملاً مشخص نشان داد.

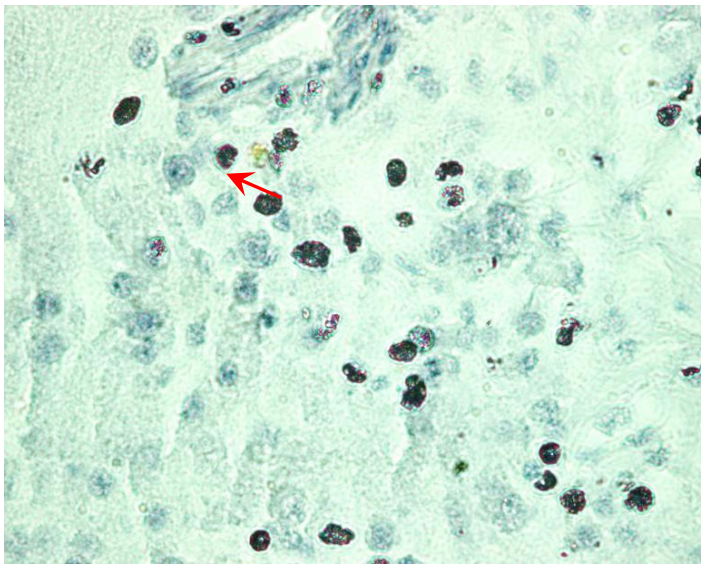
در بررسی های سرولوژی آزمایش های IFAT و IHC انجام گردید ونتایج رضایت بخش و مثبت بود(تصاویر۷۳ و۷۴).

در بررسی ویروس شناسی نتایج رنگ آمیزی منفی نمونه ها در میکروسکوپ الکترونی اجزاء ویروس را نشان داد(تصاویر شماره ۷۵ و۷۶)

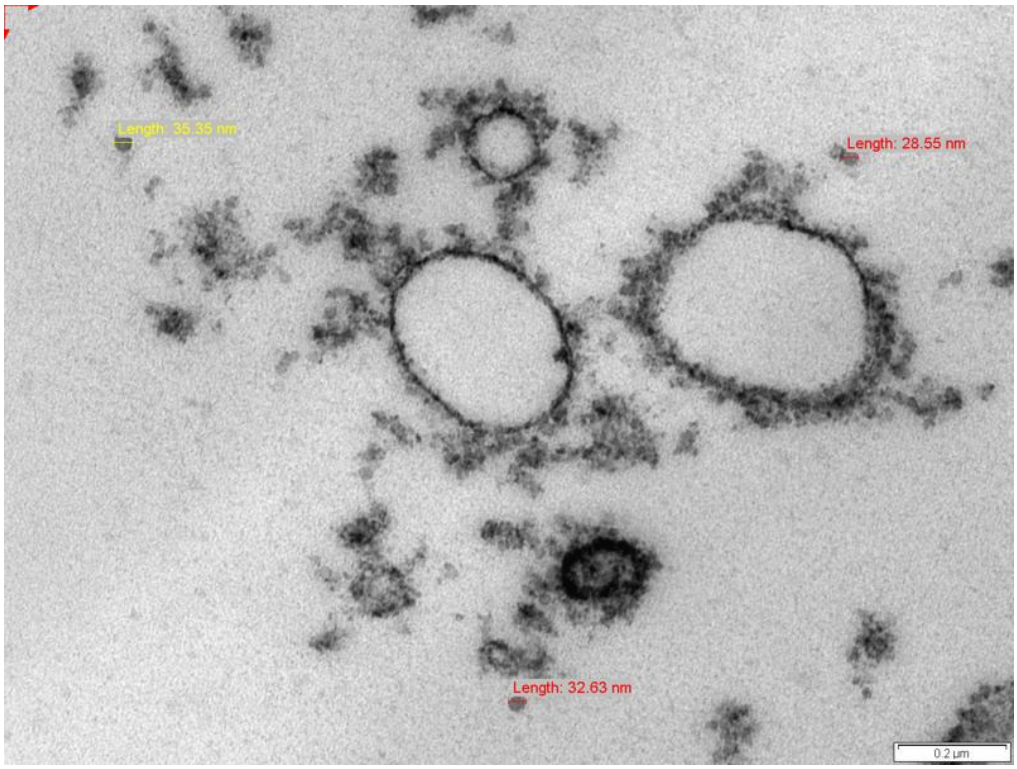
تصویر شماره ۷۲: ماهی گوپی دارای علایم بادکردگی محوطه شکمی و تیرگی چشم



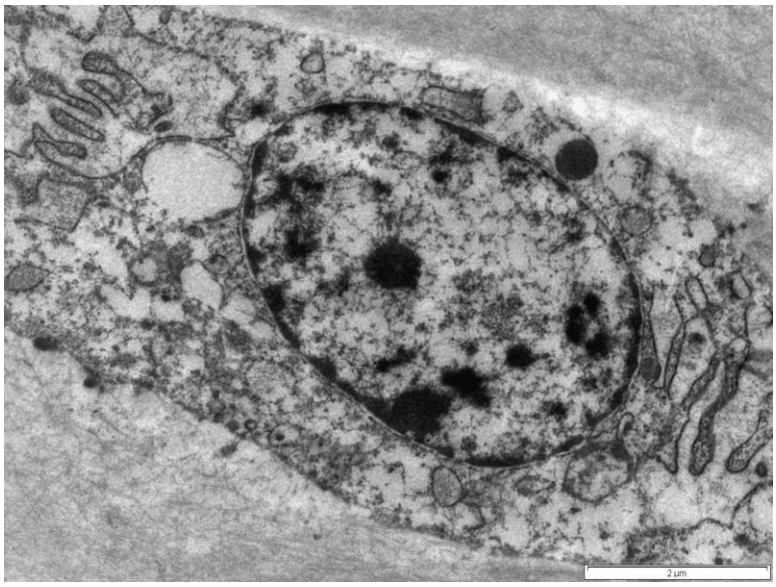
تصویر شماره ۷۳: مقطع بافت مغز ماهی گوپی که در مواجهه ٤ ساعته با ویروس قرارداشته است در آزمایش ایمونوهیستوشیمی، رنگدانه های طلائی- قهوه ای را در ماده خاکستری مغز نشان می دهد.
(پیکان)(H&E, 100X)



تصویر شماره ۷٤: مقطع بافت مغز ماهی گوپی که در مواجهه ٤ ساعته با ویروس قرارداشته است در آزمایش ایمونوهیستوشیمی، رنگدانه های طلائی- قهوه ای را در ماده خاکستری مغز نشان می دهد.
(پیکان)(H&E, 100X)



تصویر شماره ۷۵ : تصویر میکر.سکوپ الکترونی از مغز ماهی گوپی مبتلا و دارای علائم بالینی و نمایش ذرات ویروسی (Virus particles) (اندازه گیری ابعاد ذرات ویروسی با اندازه ویروس VNN استاندارد مطابقت دارد)

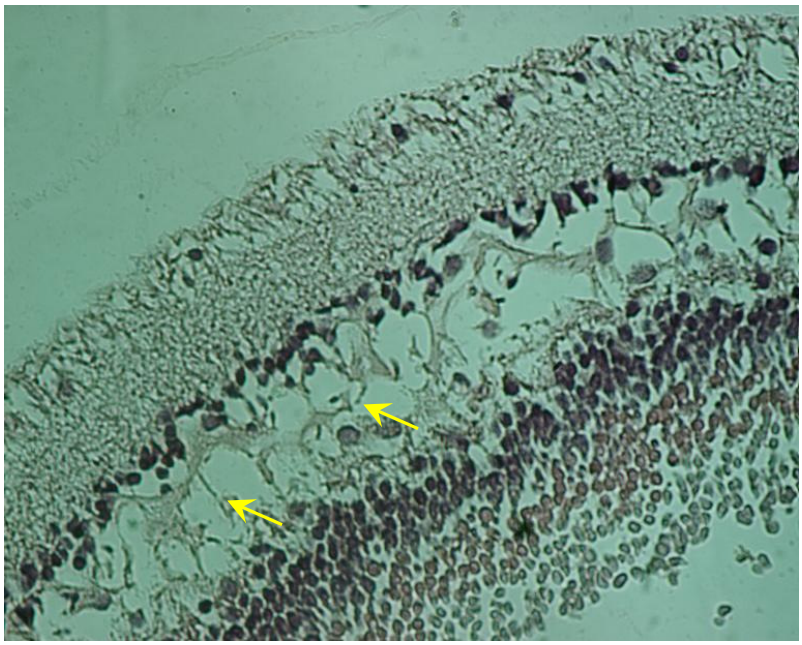


تصویر شماره ۷۶: تصویر میکر.سکوپ الکترونی از مغز ماهی گوپی مبتلا و دارای علائم بالینی و نمایش ذرات ویروسی (Virus particles)

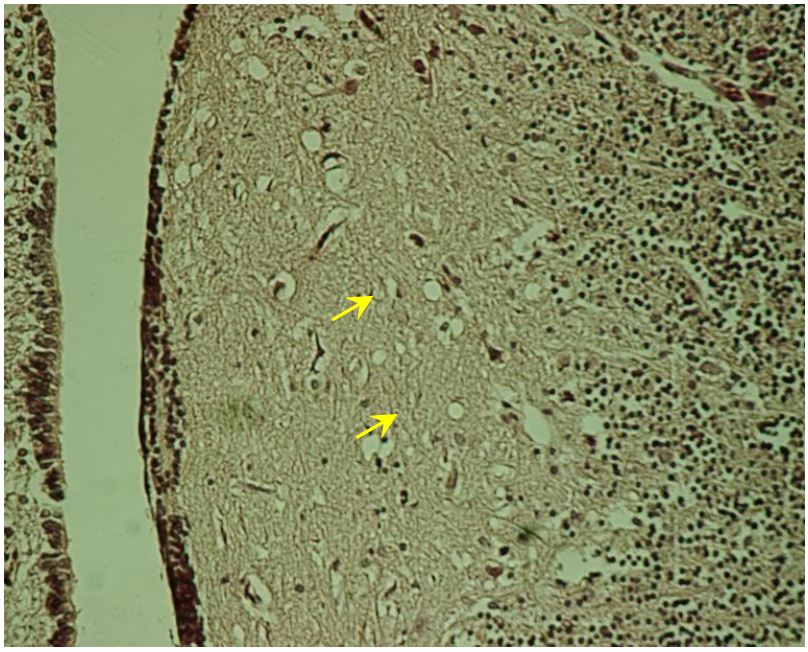
۲-۱۱-۳- مواجهه سازی بچه ماهیان قره برون

۲۱ روز پس از تزریق ویروس علایم بیماری به صورت اتساع محوطه شکمی، شنای نامتعادل و مرگ در گروههای تیمار دیده شد و در کالبد گشائی علائم پرخونی و آثار سپتی سمی در اندامها قابل مشاهده بود(تصویر شماره ۷۷). نمونه های بلوک های پارافینی جهت انجام آزمایش های تکمیلی به آزمایشگاه رفرانس سازمان OIE در ایتالیا جهت Prof.Bovo ارسال شد که ایشان نیزآزمایش های تکمیلی همچون IHC و نیز Real time PCR و Nested PCR را بر روی نمونه های ارسالی انجام داد که نتایج آن ها منفی بود. (ضمیمه شماره۵). لیکن در بررسی های آسیب شناسی انجام شده بر روی مقاطع بافتی، آثار واکوئولاسیون شدید در مغز و چشم، مشاهده گردید بگونه ای که در برخی موارد علائم واکوئولاسیون تا ناحیه مخچه، بصل النخاع و نخاع نیز استمرار داشت(تصاویر شماره ۷۸ تا ۸۳).

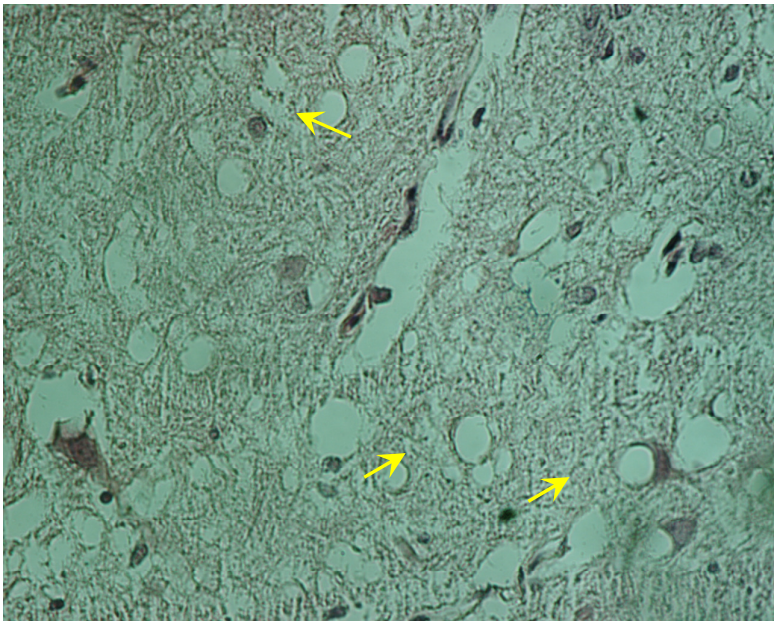
تصویر شماره ۷۷: کالبد گشایی بچه ماهیان قره برون بعد از تلف شدن



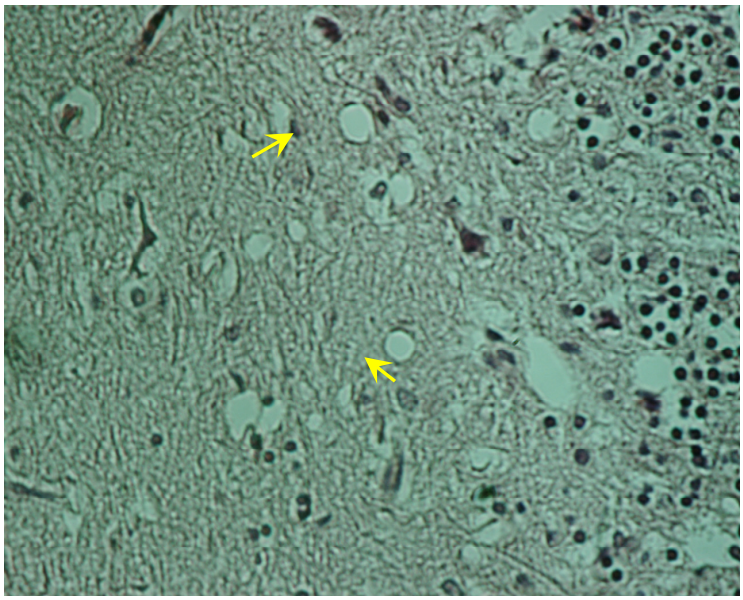
تصویر شماره ۷۸: مقطع چشم بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های متعدد (پیکان ها) (40X، H&E)



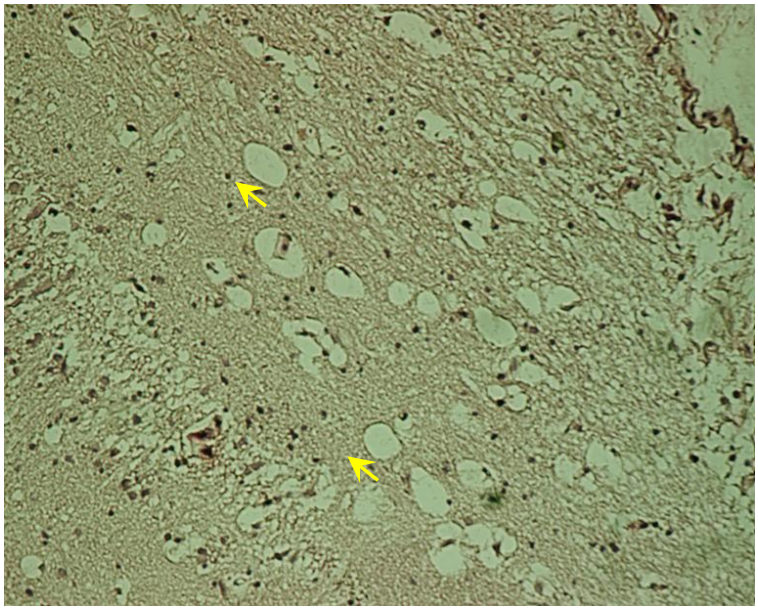
تصویر شماره ۷۹: مقطع مغز بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های فراوان در بخش خاکستری
(H&E ، 20X)



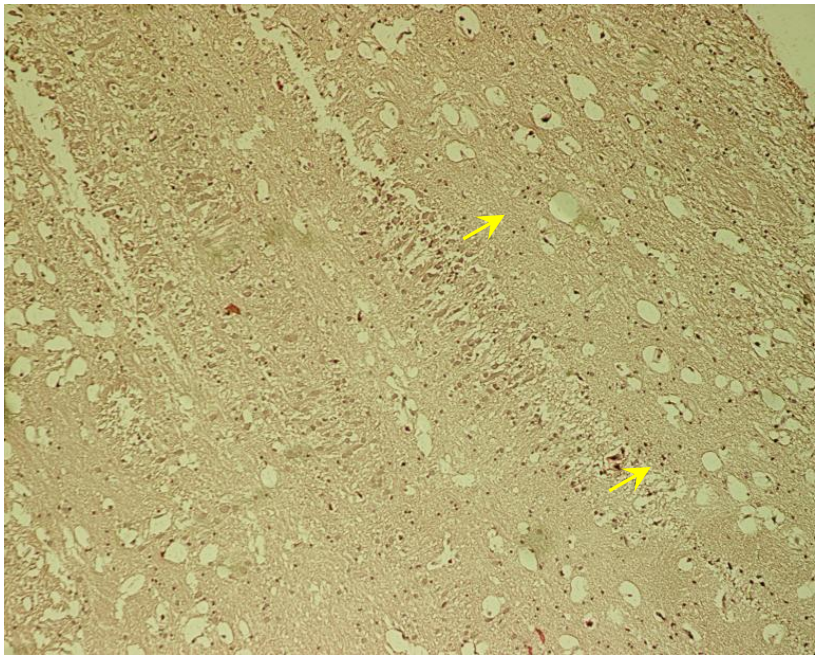
تصویر شماره ۸۰: مقطع مغز بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های فراوان در بخش خاکستری(پیکان ها)
(H&E ، 20X)



تصویر شماره ۸۱: مقطع مغز بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های فراوان در بخش خاکستری(پیکان ها) (H&E ، 20X)



تصویر شماره ۸۲: مقطع بصل النخاع بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های فراوان(پیکان ها) (H&E ، 20X)



تصویر شماره ۸۳: مقطع بصل النخاع بچه ماهی قره برون دارای واکوئول های فراوان پیکان ها (H&E ، 10X)

جدول شماره۱۰- جمع بندی نتایج در کفال ماهیان و بیماریزائی در ماهیان گوپی

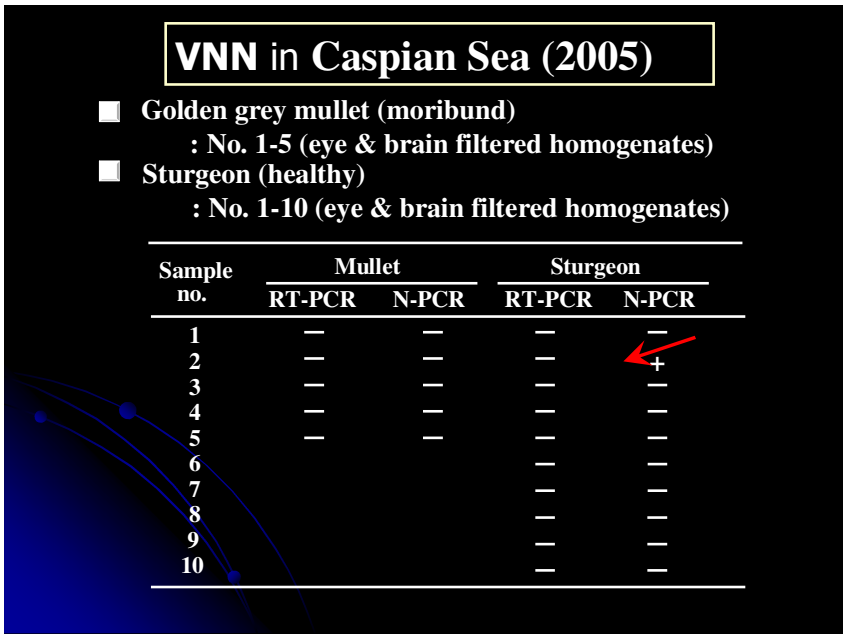
نام آزمایش	نتیجه آزمایش
کشت سلول	CPE مثبت
آزمایش IFAT	مثبت
آزمایش RT-PCR و Nested PCR	مثبت
آسیب شناسی بافتی در ماهیان بالغ	مثبت
آزمایش میکروسکوپ الکترونی	مثبت
مواجهه سازی در ماهیان گوپی	مثبت
آسیب شناسی بافتی در ماهیان گوپی	مثبت
آزمایش IHC در ماهیان گوپی	مثبت
آزمایش IFAT در ماهیان گوپی	مثبت
آزمایش میکروسکوپ الکترونی در ماهیان گوپی	مثبت

جدول شماره ۱۱: جمع بندی نتایج در ماهیان خاویاری

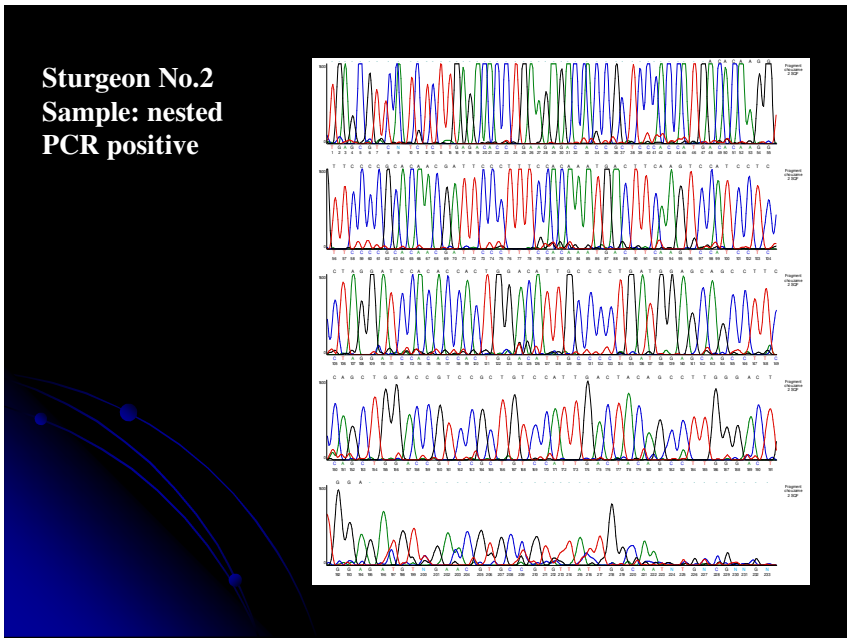
نام آزمایش	نتیجه آزمایش
کشت سلول	CPE منفی
آزمایش IFAT	منفی
آزمایش RT-PCR و Nested PCR	منفی
آسیب شناسی بافتی در مولدین	منفی
مواجهه سازی در بچه ماهیان قره برون	مثبت
آسیب شناسی بافتی در بچه ماهیان قره برون	مثبت
آزمایش IHC در بچه ماهیان قره برون	منفی
آزمایش Real time PCR و Nested PCR	منفی

با توجه به آزمایش های انجام شده می توان نتیجه گرفت که حضور بتانودا ویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در ماهیان کفال و ماهیان گوپی در آزمایش بیماریزائی به اثبات رسید ولی در نمونه های مورد مطالعه در ماهیان خاویاری حساسیت آنان به عامل بیماری به اثبات رسید ولی جداسازی و تشخیص عامل بیماری دراین تحقیق قابل شناسائی نبود و این بررسی نیاز به تحقیقات بیشترو مستمرتری دارد.

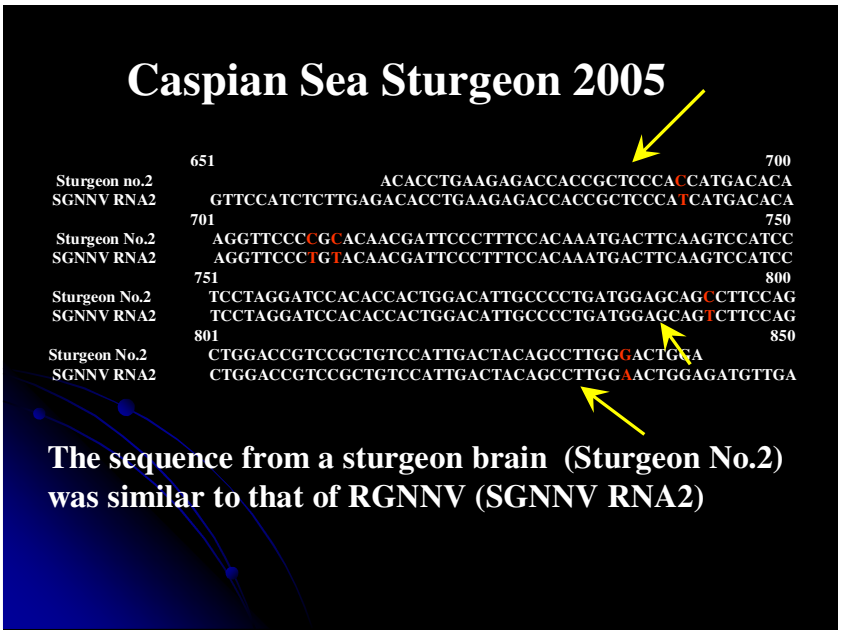
این در حالی است که در مطالعه موردی انجام شده توسط ذریه زهرا و همکاران انستیتو ماهیان خاویاری در اسفند ۱۳۸۳ که بر مبنای گشت دریایی انجام شده توسط بخش ارزیابی ذخائر انستیتو در زمستان ۸۳ صورت گرفت و ۳۲ ایستگاه دریائی در استان گیلان را تحت پوشش قرار داده بود تعداد ۷۳ عدد ماهی خاویاری بصورت تصادفی صید شد و سر ماهیان منجمد شده مورد بررسی قرار گرفته ودر مجموع ۳۵ نمونه از مغز و چشم این ماهیان بر اساس پروتکل مربوطه مورد فراوری قرار گرفت و سوپرناتانت حاصله به آزمایشگاه های رفرانس ژاپن و دانشگاه ملی تایوان ارسال شدکه درآزمایشات مولکولی با روش Nested RT-PCR انجام شده ،چهار مورد از بیست مورد نمونه های ارسالی(معادل ۲۰٪ از نمونه های فوق) از نظر وجود ویروس احتمالی مثبت اعلام گردیدند.نتایج حاصله به شرح صفحات بعد می باشد.



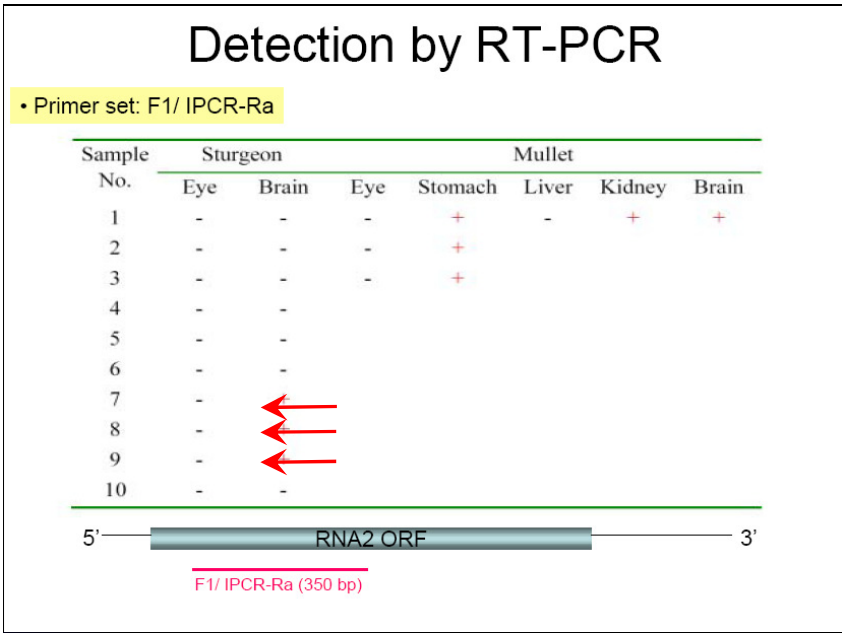
تصویر شماره ۸٤ : نتایج دریافتی از آزمایشگاه رفرانس OIE ژاپن (Prof.Nakai)
(گزارش یک مورد مثبت در ماهیان خاویاری درآزمایش Nested-PCR)



تصویر شماره ۸۵ : انجام آزمایش آنالیز سکانس بر روی نمونه مثبت به منظور شناسائی ساختار فیلوژنیکی ویروس مورد نظر



تصویر شماره۸٦: نتایج آزمایش آنالیز سکانس نمونه مثبت و مشخص شدن اختلاف در پنج باز نوکلئوتیدی در ژنوم ویروس مورد نظر



تصویر شماره۸۷: نتایج دریافتی از آزمایشگاه دانشگاه ملی تایوان (Prof. Chi Shau Chi)
(گزارش سه مورد مثبت در ماهیان خاویاری در آزمایش Nested-PCR)

٤- بحث و نتیجه گیری

بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) یک بیماری مهم در صنعت پرورش ماهیان دریایی است که همه ساله موجب وارد آمدن خسارات هنگفتی به این صنعت می شود. این بیماری گستره جغرافیایی زیادی داشته و در آب و هوای گرمسیری و معتدل تا مناطق سردسیر مشاهده می گردد. تاکنون ابتلای بیش از ۴۰ گونه از ماهیان دریایی پرورشی و وحشی به این بیماری در سراسر دنیا بجز قاره آفریقا گزارش شده و پیش بینی می گردد در آینده با معرفی گونه های جدید پرورشی این رقم نیز افزایش یابد(Arimoto و همکاران، ۱۹۹۳؛ Bovo ، ۲۰۰۷ ؛ OIE ، ۲۰۰۶؛ Munday و Nakai ، ۱۹۹۷). ماهیان مبتلا ممکن است علایم بالینی متفاوتی را با توجه به گونه، سن و دمای محیط نشان دهند. بعلاوه علایم و میزان تلفات در اشکال حاد و تحت حاد متفاوت می باشد. علایم بالینی نتیجه مستقیم ضایعات بیماری در سیستم عصبی مرکزی(CNS) و شبکیه چشم هستند که به دلیل تمایل ویروس به بافت عصبی اتفاق می افتد و عمدتا به صورت رفتار شنای غیر طبیعی مانند شنای مارپیچی، دایره ای و عدم تعادل در شنا ، تیرگی رنگ و اتساع محوطه شکمی تظاهر می یابد که بسته به سن و گونه ماهی اشکال متفاوتی دارد. مهمترین علامت کالبدگشایی نیز باد کردگی کیسه شنا می باشد. عامل بیماری یک ویروس کوچک بدون انولوپ، RNA دار متعلق به خانواده نوداویریده و جنس نوداویروس است(Munday و همکاران ، ۲۰۰۲ ؛ Bovo ، ۲۰۰۷).

بر اساس تعریف OIE ، ۲۰۰۶ ،هرگونه تلفات ماهیان که با رفتار شنای نامتعادل و واکوئولاسیون بافت عصبی به همراه وجود ذرات ویروسی از خانواده نوداویریده باشد باید به عنوان یک بیماری منفرد به نام نکروز عصبی ویروسی(VNN) یا آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی(VER) شناخته شود.

طی سالهای گذشته روشهای متعددی برای تشخیص بتا نوداویروس در نمونه های ماهی گزارش شده است که میتوان به تشخیص اولیه با استفاده از میکروسکوپ نوری، آزمایش پادتن های درخشان غیر- مستقیم(IFAT)، ایمونوهیستوشیمی (IHC) با استفاده از سرم خرگوش ضد ویروس SJNNV ، ELISA، Western blot ، *In situ* hybridization ،کشت بتا نوداویروس در تیره های سلولی حساس(1 – SSN و E11) ، میکروسکوپ الکترونی و سپس انجام آزمایش IFAT بر روی آن اشاره نمود(Munday و همکاران ۲۰۰۲).

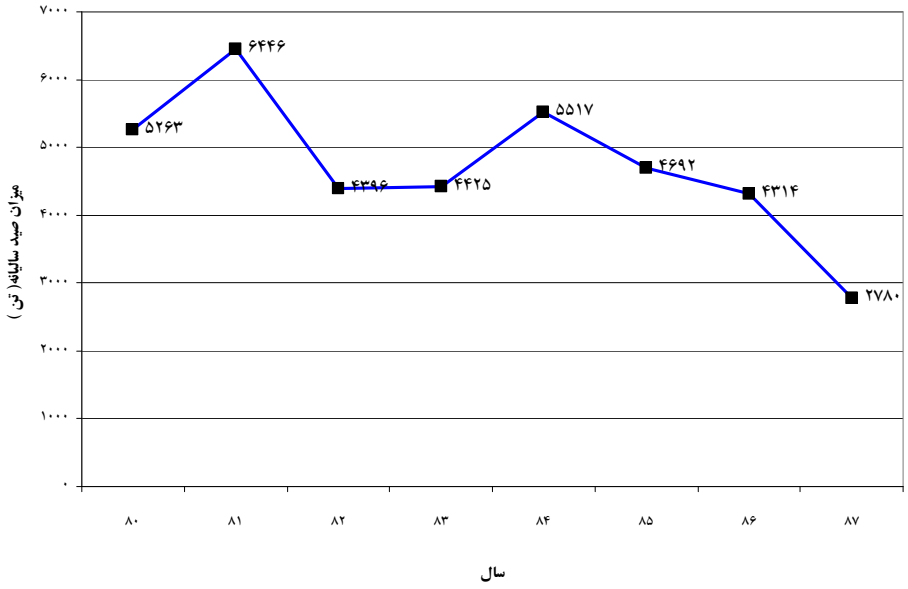
اما اخیرا آزمایشات RT - PCR با یا بدون Nested PCR خود به تنهایی و یا همراه با کشت ویروس به عنوان یکی از ابزارهای دقیق تشخیصی شناخته شده است(Dalla Valle و همکاران ۲۰۰۰، Iwamoto و همکاران ۲۰۰۱).

لیکن این تکنیک بدلیل بعضی از مشکلاتی که دارد ممکن است در مواردی به موارد مثبت یا منفی کاذب منتهی شود. به همین دلیل امروزه استفاده از Real – time PCR جهت تشخیص این بیماری پیشنهاد میگردد(Dalla Valle و همکاران ۲۰۰۵).

در این تحقیق نوداویروس عامل بیماری VNN که موجب تلفات، علایم بالینی و تغییرات بافت شناسی مغز و چشم در ماهیان کفال طلایی دریای خزر با وزن حدود ۵۰ الی ۲۵۰ گرم شده بود بر روی تیره سلولی SSN-1

تکثیر و جداسازی شده و تشخیص ویروس به روش های پادتن هـای درخشـان غیـر- مسـتقیم، Nested-RT- PCR انجام شد. ردیابی ویروس در مقاطع بافتی با روش های پادتن هـای درخشـان غیـر مسـتقیم، ایمونوهیستوشـیمی و Nested-RT- PCR انجام شد. قطعات تثبیت شده در گلوتارآلدهید ۳ درصد مربوط به نمونه هایی که در آزمایشات ذکر شده مثبت بودند جهت مشاهده ذرات ویروسی مورد آزمایش با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند.

کفال ماهیان از مهمترین و اقتصادی ترین ماهیان استخوانی دریای خزر هستند که حدود ۵۰ درصـد میـزان صـید ماهیان استخوانی دریای خزر را به خود اختصاص می دهند اما متاسفانه در سالهای اخیر میزان صید کفال ماهیـان دریای خزر به شدت کاهش یافته و از ۶۴۴۶ تـن در سـال ۱۳۸۱ بـه حـدود ۲۷۸۰ تـن در سـال ۱۳۸۷ (مـدیریت ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات شیلات) رسیده است.



نمودار۱٤-میزان صید کفال ماهیان دریای خزر در سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۷

کاهش میزان صید در دهه اخیر با وقوع تلفات نامتعارف کفال ماهیان در طـول سـال و بـویژه مشـاهده تلفـات در فصل صید همراه بوده است. علایم بالینی گزارش شده در ماهیان در حـال تلـف شـدن شـامل بـی حـالی، شـنای نامتعادل، تیرگی رنگ، اگزوفتالمی دوطرفـی، خـونریزی در سـطح پوسـت، حالـت خوابیـده بـر پشـت و اتسـاع محوطه شکمی بود. علائم مزبور در برخی بیماری هـای باکتریـائی همچـون اسـترپتوکوکوزیس(گـرم مثبـت) ، *Eubacterium terantellus* (گرم منفی) و ویبریوزیس نیز مشـاهده مـی شـود . ایـن بیمـاری هـا موجـب منتزیـت و منگوآنسفالیت می گردد. از سوی دیگر تک یاخته *Spharospora sp.* که در کیسه شنا زنـدگی مـی کنـد موجـب بروز علائم مشابه می گردد. در بررسی کالبدگشایی،کیسه شنای متورم مشاهده شد. علایم بالینی، کالبدگشایی و

شدت تلفات بر اساس تعاریف ذکر شده در بالا احتمال حضور و نقش نوداویروس را در تلفات کفال ماهیان نشان می داد.

در ماهیان فیزوکلیستوس، غده قرمز یا غده گازی در کیسه شنا نقش مهمی در تولید یا جذب گاز در کیسه شنا داردکه در حفظ تعادل و تغییر وضعیت شنا در اعماق مختلف آب موثر است(Alexander و همکاران، ۱۹۹۷). در این بررسی بادکردگی کیسه شنا و اتساع محوطه شکمی همانگونه که Fukuda ، و همکاران، ۱۹۹۶ و Munday و همکاران، ۲۰۰۲ تشریح کرده بودند مشاهده شد. Pirarat و همکاران، ۲۰۰۹، آن‌را به اختلال در کار غده گازی مربوط دانستند اما ممکن است که کیسه شنا ارگان هدف نوداویروس نباشد زیرا Pirarat نتوانست ذرات ویروسی را به روش های ایمونوهیستوشیمی ، RT-PCR ، *In situ* hybridization و میکروسکوپ الکترونی در کیسه شنا مشاهده یا ردیابی کند. Wurtz و همکاران (۱۹۹۹)، معتقدند زمانی که ماهی توانایی شنای طبیعی را در اثر عفونت نوداویروسی مغز و چشم از دست می دهد ممکن است اختلال در عملکرد غده گازی به دلیل افزایش متابولیت های سمی مانند اسید لاکتیک اضافی حاصل از آنیدریداز کربونیک در غده گازی ایجاد گردد. نوداویروس می تواند در بافتهای مختلف بر اساس گونه و سن ماهی ردیابی و مشاهده شود. در ماهیان جوان و لاروها نوداویروس می تواند در سلولهای مختلف از جمله سلولهای عصبی، اپیتلیالی، قلبی و سلولهای خونی دیده شود ولی سلولهای عصبی در مغز و چشم سلولهای هدف اصلی هستند (Tanaka و همکاران، ۲۰۰۱).

با توجه به دستورالعمل OIE (۲۰۰۶) که شناسایی ویروس را منوط به جداسازی آن بر روی تیره سلولی SSN-1 و تشخیص ویروس جدا شده به کمک دو روش همزمان پادتن های درخشان غیر مستقیم و RT- PCR می‌داند تاکنون سابقه ای از جداسازی و تشخیص کامل بیماری در ایران وجود ندارد. لذا این تحقیق برای جداسازی و تشخیص کامل نوداویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی بر اساس دستورالعمل OIE، ۲۰۰۶ انجام شد.

در مقاطع بافت شناسی مغز و چشم کفال ماهیان دارای علایم بالینی، واکوئولاسیون و نکروز در سلولهای عصبی مغز، نخاع و لایه گرانولار شبکیه چشم مشاهده شد که مشابه علایم ذکر شده توسط سایر محققین بود(Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵؛ Comps و Raynold ،۱۹۹۶؛ Grove و همکاران، ۲۰۰۳).

محققین بسیاری در جداسازی نوداویروس بر روی تیره های سلولی موفق نبوده اند (Breuil و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Mori و همکاران، ۱۹۹۱؛ Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۴؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵) به طور کلی تیره های سلولی معدودی برای تکثیر نوداویروس وجود دارد ولی تیره سلولی SSN-1 که از ماهی *Striped snakehead* مشتق شده اولین و موثر ترین تیره سلولی است که توسط OIE و بسیاری از محققین برای جداسازی نوداویروس توصیه شده است (OIE ۲۰۰۶؛ Bovo ،۲۰۰۷؛ Frerichs، ۱۹۹۶).

در این تحقیق برای جداسازی عامل ویروسی احتمالی، بافتهای مغز و چشم ماهیان کفال دارای علائم بالینی را در بوته چینی هموژن کرده و پس از فیلتر کردن بر روی تک لایه سلولی SSN-1 تلقیح نموده و در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ قرار داده شد. آثار آسیب سلولی CPE ، ۶ روز بعد از تلقیح هموژن فیلتر شده بافتهای مغز و چشم کفال به صورت

گرد، دانه دار و واکوئوله شدن سلولها در برخی نقاط ایجاد شده و به تدریج به تمام لایه سلولی گسترش پیدا کرد و سلولها شروع به جدا شدن از کف فلاسک نمودند. میزان CPE در سه پاساژ بعدی افزایش پیدا کرد. تیتر ویروس نیز به میزان 10^{4} $TCID_{50}$ به ازای هر میلی لیتر محاسبه شد. این علایم در بسیاری از مقالات به عنوان آثار آسیب سلولی ناشی از نوداویروس عنوان شده است.(Iwamoto و همکاران، ۱۹۹۹؛ Chi و همکاران، ۱۹۹۹؛ Bovo، ۲۰۰۷)

تشخیص ویروس به روش پادتن های درخشان غیرمستقیم پس از ایجاد CPE در سلولهای SSN-1 و در مقاطع بافتی پارافینه با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی ضد نوداویروس ساخت شرکت Aquatic diagnostics انجام شد و ظهور نقاط درخشان در داخل سلولهای SSN-1 آلوده حاکی از حضور آنتی ژن های نوداویروس در سیتوپلاسم سلولها و واکنش آنها با آنتی بادی ضد نوداویروس تهیه شده در موش و به‌طور غیرمستقیم با آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین موشی فلورسئینه تهیه شده در خرگوش بود. به‌طور همزمان آزمایش پادتن های درخشان غیرمستقیم به روش ذکر شده در بالا بر روی مقاطع بافت مغز و چشم پارافینه ماهیان کفال دارای علایم انجام شد و مانند سلولهای SSN-1 آلوده نقاط درخشان در لایه گرانولار شبکیه چشم نشانه حضور نوداویروس بود. این روش به عنوان یک روش دقیق و حساس برا ی موارد بالینی بیماری توصیه شده است (OIE، ۲۰۰۶؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶؛ Bovo، ۱۹۹۹ b؛ Tanaka، ۱۹۹۸).

روش دیگر توصیه شده برای ردیابی نوداویروس روش Nested-RT- PCR است. بیشتر روش‌های PCR برای تکثیر قطعه کوچکی از RNA_2 که پروتئین کپسید را کد می کند طراحی شده‌اند (Nishizawa و همکاران ۱۹۹۴; Thiery و همکاران Dallavalle ; 1999b و همکاران ۲۰۰۰; Grotmol و همکاران ۲۰۰۰; Skliris و همکاران ۲۰۰۱).

در آزمایش Nested RT-PCR انجام شده بر روی نمونه های بافتی مغز و چشم کفال ماهیان، حضور ژنوم نوداویروس در۲۱ نمونه از ۳۱۲ ماهی کفال طلایی دارای علایم بالینی با ایجاد باند ۲۸۹ bp در ژل آگارز ۲ درصد، مثبت تشخیص داده شدند. همچنین نتایج این آزمایش بر روی سلولهای آلوده شده SSN-1 حضور نوداویروس را تایید نمود.

در بررسی های انجام شده مولکولی در پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری) در آزمایش اول که بر اساس دستورالعمل شرکت IQ2000 و با استفاده ازکیت مربوطه صورت گرفت به جز دو مورد از نمونه های مغز استفاده شده برای آزمایشات مولکولی بقیه نمونه ها منفی بود. در تکرار آزمایش برای دو نمونه مشکوک نیز باند مورد نظر بدست نیامد و نمونه منفی تلقی شد. با توجه به آنچه که ذکر شد علیرغم منفی بودن جواب آزمایشات PCR و اینکه در منابع عنوان شده که تنها با یک روش نمی توان حضور ویروس را اثبات یا رد نمود، لذا نمی توان وجود بیماری نکروز عصبی را با توجه به علایم بالینی محرزی که وجود داشته و سایر شواهد پاراکلینیکی در این منطقه رد نمود.

در روش ایمونوهیستوشیمی، ذرات ویروسی و تغییرات بافتی ناشی از ویروس قابل مشاهده است. این روش بر پایه استفاده از یک آنتی سرم علیه یک آنتی ژن خاص یا آنتی ژن های مشابه استوار است و سویه های نوداویروس مختلف از نظر سرولوژیکی قابل تفریق می باشند (Skliris و همکاران، ۲۰۰۱؛ Mori و همکاران، ۲۰۰۳). یک آنتی سرم ممکن است علیه یک سویه خاص واکنش نشان دهد ولی علیه سویه های دیگر که از نظر سرولوژیکی متفاوتند واکنش نشان ندهد. اولین ردیابی نوداویروس جداشده از آتلانتیک هالیبوت بوسیله IHC با استفاده از یک آنتی سرم ضد SJNNV انجام شد. (Grotmol و همکاران، a ۱۹۹۷) و بارها نیز در مطالعات دیگر استفاده شد (Grotmol و همکاران، ۱۹۹۹؛ Grotmol و همکاران، ۲۰۰۰؛ Denevig و همکاران، ۲۰۰۰). بعدها آنتی سرم ضد نوداویروس جداشده از آتلانتیک هالیبوت نیز ساخته شد و استفاده شد (Johansen و همکاران، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳؛ Grove و همکاران، ۲۰۰۳؛ Sommerset و همکاران، ۲۰۰۵). در این تحقیق از مونوکلونال آنتی‌بادی ساخت شرکت Aquatic diagnostic (دانشگاه استرلینگ) برای آزمایش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. این مونوکلونال آنتی بادی با نوداویروس های جداشده از *Sea bass* اروپایی (RGNNV) و آتلانتیک هالیبوت و آتلانتیک کد واکنش نشان می دهد(thiery و همکاران، ۱۹۹۹) ولی با نوداویروس جداشده از *Striped snakehead* (SJNNV) واکنش نشان نمی دهد (Grotmol و همکاران، ۲۰۰۰؛ Starkey و همکاران، ۲۰۰۰ و ۲۰۰۱). زیرا تفاوت فیلوژنتیکی زیادی بین این سویه و سویه های دیگر نوداویروس وجود دارد (Nishizawa و همکاران، ۱۹۹۷).

در آزمایش ایمونوهیستوشیمی انجام شده بر روی مقاطع مغز و چشم ماهیان نقاط متمرکز یا پراکنده قرمز- قهوه ای درخشان در زیر میکروسکوپ نوری دیده شد که حاکی از حضور آنتی ژنهای نوداویروس در بافت بود. مجموع نتایج حضور نوداویروس را بافتهای عصبی و چشم کفال ماهیان دریای خزر تاییدکرده و نشان می دهد که علایم بالینی و تلفات کفال ماهیان در ارتباط با ابتلا به بیماری نکروز عصبی ویروسی می باشد.

Galzebrook و همکاران(۱۹۹۰)، انتقال افقی بیماری را با مجاور قرار دادن لاروهای سالم و آلوده *Lates calcarifer* اثبات کرد.

در مطالعه دیگر ایجاد عفونت تجربی در نوزادان هامور خال قرمز *Epinephelus akaara* از طریق داخل صفاقی و حمام ، ۱۴-۱۰ روز پس از مواجهه سازی آثار آسیب بافتی شبیه عفونت طبیعی با میزان مرگ و میر کمتر ایجاد گردید.(Mori و همکاران، ۱۹۹۱) همچنین بیماری در لاروهای سالم ماهی (*Pseudocaranx dentex*) Striped jack از طریق حمام یا مجاورسازی لاروهای سالم و بیمار ایجاد شد.(Arimoto و همکاران، ۱۹۹۳ ؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶)

در هامور مالابار *Epinephelus malabaricus* ، بیماری با تزریق داخل صفاقی مواد آلوده، منتقل شد و علایم بالینی مانند عفونت طبیعی بوده و میزان مرگ و میر ۶۰ – ۴۰ درصد عنوان شد. در این گونه در هر دو حالت عفونت تجربی و طبیعی فاز حاد بیماری ایجاد نمی شود در حالیکه در شرایط پر استرس می توان حالت حاد بیماری را مشاهده کرد.(Boonyaratpalin و همکاران، ۱۹۹۶ ؛ Thiery و همکاران ، ۱۹۹۷) میزان مرگ و میر۲۸ درصد را

در نوزادان *Sea bass* اروپایی پس از تزریق داخل عضلانی هموژن مغز آلوده اعلام نمود.(Peducasse و همکاران، ۱۹۹۹) نشان دادند که عفونت تجربی از طریق خوراکی، حمام و مجاورت ماهی سالم و بیمار در گونـه *Sea bass* اروپایی به صورت تحت حاد با آسیب های عصبی و مرگ و میرکم ایجاد می گردد.

از سوی دیگر بر اساس مطالعات انجام شده مشـخص گردیـده کـه بـیش از ۳۰ گونـه از ماهیـان دریـایی بـه ایـن ویروس حساس هستند و در این میان گروه زیادی از ماهیان دریایی پرورشی به چشم می خورند این بـدین معنـا است که بروز بیماری نکروز عصبی عموما از ماهیان دریایی گزارش شده که مرحله ای و یا تمام مراحل تکثیر و پرورش آنها در محیط های مصنوعی صورت گرفتـه اسـت (Mundday و همکـاران ۲۰۰۲، OIE ۲۰۰۰، Hegde و همکاران ۲۰۰۵، Buchan و همکاران ۲۰۰۶). لیکن بر اساس یافته های این تحقیق، این بیماری در حالی از کفـال ماهیان دریای خزر گزارش میشود که این ماهی کاملا وحشی است و کلیه مراحل تکثیر و پرورش آن در طبیعت صورت می گیرد و تاکنون در خصوص تکثیر مصنوعی این گونه های در معرض خطـر از کفـال ماهیـان (*Liza saliens* ونیز گونه *Liza auratu*) که بیشـترین گـزارش طـی سـالهای اخیـر از ابـتلای آنهـا بـوده اسـت، هیچگونـه موفقیتی حاصل نشده است و تنها در خصـوص تکثیـر مصـنوعی گونـه کفـال خاکسـتری *(Mugil cephalus)* طـی سالهای اخیر دستاوردهای مثبتی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر بدست آمده است (محمود قانعی تهرانـی، ۱۳۸۱) . با توجه به این مسئله میتوان عنوان نمود که با مشاهده این علایم در ماهیان کفال طلایی و پـوزه باریـک می توان آنها را در زمره میزبانان حساس به این ویروس قلمداد نمود. از طرفی بر اساس گزارشـات محققـین دنیـا بیشترین میزان تلفات ناشی از این ویروس در مراحل لاروی و بچه ماهی نورس اتفـاق مـی افتـد. البتـه حساسـیت بالای ماهیان در مراحل اولیه زندگی(مراحل لاروی و نورس) به ایـن معنـی نیسـت کـه ماهیـان بـالغ در اثـر ایـن بیماری متحمل تلفات نمی شوند بر اساس آخرین یافته های علمی علاوه بر ابتلای ماهیان بالغ در دو گونه کفـال طلایی و پوزه باریک در ایران ماهیان دیگری همچون هامور قهوه ای یـا Brown grouper *E. malabaricus* (Bloch & Schneider), ماهی هامور هفـت خـط یـا Seven-banded groupers *E. septemfasciatus* Thunberg ، مـاهی هـامور چـرب یـا همـان(Forsskal) *E. tauvina* Greasy grouper ، مـاهی سـوکلا یـا (L.) *Rachycentron canadum* Cobia ، مارماهی اروپائی یا (L.) *Anguilla anguilla* Euorpean eel ، از جمله ماهیـانی مـی باشـند کـه در شـکل بـالغ نیـز بـه ویروس عامل بیماری نکروز عصبی حساس می باشند.(سخنرانی ارائه شده از خانم Prof.Chi در اولین سمپوزیوم بیماری نکروز عصبی ویروسی، هیروشـیمای ژاپـن، ۲۰۰۶) و (Bovo و همکـاران ۱۹۹۹، OIE ۲۰۰۰، Murogo و همکاران ۲۰۰۱، Oh و همکاران ۲۰۰۲، Hegde و همکاران ۲۰۰۵). در مطالعات قبلی صـورت گرفتـه در ایـران از سال ۱۳۸۲ تا کنون هیچ گزارش مستندی در مورد مرگ و میر بچـه ماهیـان کفـال وجـود نداشـته اسـت و بـروز بیماری فقط در ماهیان بالغ گزارش شده است (ذریه زهرا و همکاران، ۲۰۰۵ ؛ سعیدی و همکاران، ۱۳۸۴).

در بررسی های انجام شده توسط سعیدی و همکاران (۱۳۸۴)، در ماهیان صـید شـده درفصـل تابسـتان هیچگونـه علایم بالینی که در بیماری نکروز عصبی ویروسی گزارش شده باشد وجود نداشت. لیکن در ماهیان صـید شـده

در فصل زمستان علایم بالینی توصیف شده در این بیماری بوضوح مشاهده شد. این درحالی است که متوسط سن ماهیان صید شده در این مرحله بیش از ۳ سال بوده است و این مسئله کاملا با یافته های قبلی دیگر محققین مطابقت دارد.

یکی دیگر از ابزار های تشخیصی در این تحقیق انجام آزمایش های هماتولوژی و سرمی بود که با هماهنگی های قبلی در پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری) صورت گرفت. بدون شک ارزیابی پارامترهای سلولی، سرمی و بیوشیمیایی خون در حیوانات روشی معمول و ابزارمهم تشخیصی در دامپزشکی است. این تکنیک ساده اطلاعات ضروری در مورد وضعیت فیزیولوژیکی حیوانات را فراهم نموده و به این ترتیب در اتخاذ بهترین روش درمانی و یا دقت در پیش آگهی بیماری به کلینیسین کمک میکند(Groff و Zinkl ۱۹۹۹).

آنالیز فاکتورهای سلولی و بیوشیمیایی خون می تواند تغییرات پاتوفیزیولوژیکی حاد یا مزمنی را که به تغذیه، کیفیت آب، سموم و بیماریها نسبت داده میشود را مشخص نماید. لیکن از آنجایی که فاکتورهای خونی ماهیان به شدت تحت تاثیر عواملی همچون تغذیه، سن، جنس و شرایط محیطی است و نیز در این موجودات بر خلاف مهره داران خونگرم مرجع معین جهت تجزیه و تحلیل های هماتولوژیک وجود ندارد کاربرد تشخیصی این ابزار ارزشمند از گستردگی کمتری در بیماریهای ماهی برخوردار است(Hrubec و همکاران ۲۰۰۱).

با همه این اوصاف سابقه بررسی تغییرات فاکتورهای سلولی و بیوشیمیایی خون در ماهیان بیمار به سالهای ۱۹۷۱ – ۱۹۶۹ باز میگردد. لیکن در آغاز دهه ۸۰ میلادی این امر از توسعه و توجه بیشتری برخوردار گردید(Rehulka، ۲۰۰۲).

در واقع تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، پاسخ فیزیولوژیک ماهی نسبت به استرس‌های محیط زندگی مثلاً آلودگی محیط به فلزات سنگین (Vosyliene ,1996) و یا عفونت های میکروبی (Austin,1987) است.

درماهی اغلب عفونت های باکتریایی (Flavobacterium، Vibrio، Edwardsiella، Aeromonas) و ویروسی (IPN و IHN و VHS) سپتی‌سمیک و خونریزی دهنده می‌باشند و در اثر بروز عارضهٔ سپتی‌سمی، اغلب بافت‌های داخلی، بویژه بافت‌های مهمی را که در فیزیولوژی ماهی نقش موثری دارند (کلیه، کبد، طحال، پانکراس) تحت تأثیر آلودگی قرارمی‌دهند. (Austin,1987) و سبب می‌شوند که تغییرات خونی را که محصول واکنش بافت‌ها نسبت به عفونت‌هاست را به دنبال داشته باشند.

در بیماری‌های عفونی با منشأ باکتریایی و ویروسی، سیستم دفاع غیراختصاصی (سلولی) تحریک و فعال می‌گردد. دراین گونه موارد اغلب لکوسیت‌ها افزایش می یابند (لکوسیتوز) تا بدن را با مکانیسم فاگوسیتوزیس و تولید مواد ضد باکتریایی و یا ویروسی در مقابل بیماری مراقبت نمایند. هرچند در برخی از این عفونت‌ها، به دنبال یک لکوسیتوز اولیه در مراحل اولیه ابتلا بویژه در آلودگی‌های ویروسی، متعاقب آن تعداد لکوسیت‌ها کاهش می‌یابد (لکوپنی). این مسئله اینگونه قابل توجیه است که در عفونت‌هایی که عامل بیماریزا از نوع انگل اجباری داخل سلولی هستند (ویروس‌ها و برخی از باکتری‌ها که پس از فاگوسیت‌شدن در داخل سیتوپلاسم

فاگوسیت‌ها زنده مانده و تکثیر می‌شوند) از این طریق تعداد لکوسیت‌ها را کم می‌کنند و یا نیمه عمر سلولی را کاهش می‌دهند.

(Weiser & Haley ; 1992) در یک مطالعه برروی بیماری ویروسی نکروزدهنده اریترویست‌ها برروی ماهی آزاد چام[۱] گزارش نمودند که که تعداد گلبول‌های قرمز (R.B.C) و پارامترهای وابسته به آن مثل هماتوکریت (Hct) و هموگلوبین (Hb) کاهش پیدا می‌کنند ولی تعداد گلبول‌های سفید (W.B.C) ماهی افزایش می‌یابند.

کاهش میزان گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در قزل آلاهای رنگین کمان مبتلا به بیماری ویروسی نکروز عفونی بافت های خونساز[۲] (IHN) و بیماری باکتریایی کلیه[۳] (BKD) نیزمشاهده شده است. همچنین در ماهیان آزاد اقیانوس اطلس مبتلا به عفونتهای آئروموناسی و ویبریوزیس نیزچنین کاهشی دیده شده است. لیکن در تمام اینها تغییراتی از نظر اندیسهای MCV، MCH و MCHC مشاهده نشده است(Rehulka ۲۰۰۲) .

مطالعات نشان داده است در زمان بروز خونریزی یا ایجاد ضایعات خونریزی دهنده کاهش گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده میشود، لیکن تغییری در اندیسهای خونی بوجود نمی آید. ثبات این اندیسها نشان از عدم اختلال در روند اریتروپویزیس میباشد(Waagbø و همکاران ۱۹۸۸).

علیرغم این موضوع، (Amend & Smith;1992) در گزارش پاتوفیزیولوژی بیماری (IHN) در یک عفونت تجربی در ماهیان قزل آلا ، نشان دادندکه در ماهیان مبتلا میزان گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت ولی سایر اندیس های خونی همچون MCV، MCH و MCHC طبیعی بود (علیرغم آنکه این بیماری بشدت بر روی قسمت خونساز کلیه اثر تخریبی داشته و موجب اختلال در روند اریتروپویزیس می شود).

در این بررسی در ماهیان صید شده در زمستان، در ماهیان واجد علایم بالینی کاهش معنی داری درمیزان گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده شد. این در حالی بود که اندیسهای خونی مانند MCHC و MCV نیز در این ماهیان ثابت نمانده و نسبت به ماهیان سالم افت معنی داری را نشان میداد ولی در میزان MCH تفاوتی در بین دو گروه مشاهده نشد. با توجه به نتایج فوق مشخص گردید که ماهیان بیمار مبتلا به آنمی از نوع ماکروسیتیک هیپوکرومیک بودند.

بررسی های مختلف نشان داده است که کم خونی ماکروسیتیک هیپوکرومیک عمدتا در اثر کمبود اسید فولیک و ویتامین B12 و بطور کلی سوء تغذیه ایجاد میشود. پدیده ای که در اغلب بیماری های عفونی (با منشا باکتریائی یا ویروسی) عارضه ای طبیعی و ثانویه بوده و متعاقب پیشرفت بیماری و ضعف سیستم ایمنی ماهیان گریبانگیر ماهیان می شود. بعلاوه کمبود ویتامین C، نیاسین، پیرودوکسین، اینوزیتول، ریبوفلاوین (بطور کلی کمبود ویتامینهای خانواده B) و آهن میتواند ایجاد آنمی تغذیه ای نماید(Stoskopf و همکاران۱۹۹۳ ،Johan و

---

[۱]- Chum Salmon *(Oncorhynchus keta)*
[۲]- Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)
[۳]- Bacterial Kidney Diseases (BKD)

Mahajan ۱۹۷۹). ضمن آنکه کفال ماهیان از نظر تغذیه ای دیتریت خوار[۱] بوده و با توجه به نوع غذای مصرفی و اینکه همراه این دسته از مواد غذایی، بقایای آلاینده ها (سموم نباتی، هیدروکربورهای نفتی، فلزات سنگین) و پروتئین های سمی ممکن است مورد استفاده قرار گیرند لذا بیشتر در معرض این نوع آلودگی ها و تضعیف سیستم ایمنی قرار دارند.

اصولا بروز عفونتهای باکتریایی موجب افزایش گرانولوسیتها و کاهش لنفوسیتها می شود که میتواند ناشی از سپتی سمی باکتریایی باشد. لیکن بروز لکوسیتوز در مرحله اول و سپس پدیده لوکوپنی همراه با لنفوپنی و یک نوتروفیلی نسبی در پاسخ به یک عفونت های ویروسی ایجاد می شود.(این تابلوی خونی در بروز تلفات سال ۱۳۸۲ در منطقه زیبا کنار گیلان نیز مشاهده شد، ذریه زهرا و همکاران، ۲۰۰۵) لیکن لکوپنی(کاهش لکوسیت ها) همراه با لنفوپنی (کاهش لنفوسیت ها) و نوتروپنی (کاهش نوتروفیل ها) بطور معمول در مواقع ضعف و کلاپس کامل سیستم ایمنی و یا درگرسنگی طولانی مدت ایجاد میشود. در مطالعات انجام شده بر فعالیت سیستم ایمنی مشاهده شده است که با کاهش لوکوسیتها، بدن جهت حفظ سطح ایمنی تلاش در جهت جایگزینی سلولهای ایمنی از دست رفته را دارد. لیکن در مواردی که این کاهش سریع و غیر قابل جبران باشد فرصت برای طی تمامی مراحل تکاملی سلولی وجود نداشته و سلولها بصورت نارس به خون وارد میشوند. با توجه به اینکه سلولهای میلوسیتی سیر تکاملی خود را کامل نکرده اند لذا از عملکرد مناسب برخوردار نبوده در مواردی چون فاگوسیتوزیس ناتوان هستند در نتیجه قادر به ایفای درست نقش خود در بهبود عملکرد سیستم ایمنی نمی باشند و در چنین حالتی ماهیان به نوعی ضعف ایمنی مبتلا هستند. بروز پدیده نوتروپنی در ماهیان می تواند انعکاسی از هجوم نوتروفیل ها به یک کانون عفونت در مراحل انتهائی و شاخصی از روند مزمن شدن بیماری باشد. (Clauss و همکاران ۲۰۰۸).

در بررسی نتایج بدست آمده در مورد گلبولهای سفید یک پن لکوپنی به چشم میخورد و لکوپنی و نوتروپنی در مقابل میلوسیتوزیس در تابلوی خونی ماهیان بیمار مشاهده شد. این یافته در بررسی که سعیدی و همکاران (۱۳۸۴) طی نمونه برداری از کفال ماهیان واجد علایم بالینی از زمستان ۱۳۸۳ تا تابستان ۱۳۸۴ داشتند نیز مشاهده شده گزارش گردید.

به نظر می رسد افزایش تعداد میلوسیتها در ماهیان بیمار نشانه تلاش بدن در جهت جایگزینی سلولهای از دست رفته است، لیکن از آنجایی که این کاهش شدید بود، روند تکاملی سلول کامل نشده و میلوسیتها وارد خون شده بودند و پدیده میلوسیتوزیس حادث گردید.

کاهش سطوح پروتئین های سرم خون در بسیاری از بیماری های مختلف ماهیان گزارش شده است (Hunn, 1964 . قبلا Dorson، ۱۹۷۲) در بیماری IHN گزارش کرده بود که هیچ کاهش آشکاری در میزان پروتئین های سرم خون ماهیان مبتلا مشاهده نشده است ولی تغییرات اختصاصی در برخی از پروتئین های سرم خون قابل

[۱]- Detritus

ردیابی است. (Klontz و همکاران، ۱۹۶۵) افزایش میزان بخش beta-2 پروتئین سرمی را در ماهیان Chinook salmon زنده مانده از بیماری IHN را در بررسی های خود مطرح و پیشنهاد داده بودکه این موضوع می تواند بیانگر اهمیت ایمنولوژیکی موضوع باشد. در واقع فعالیت تولید پادتن در ماهیان زنده ناشی از مهاجرت آهسته ماکروگلوبولین هاست. از سوی دیگر (Rehulka و همکاران، ۲۰۰۵) نشان داده است که کاهش پروتئین های خون[1] می تواند پاسخ متابولیکی ماهی به نحوه تغذیه ، عفونت های با منشا باکتریائی یا ویروسی و یا سموم مختلف باشد.

در بیماریهای عفونی مانند ویبریوزیس، استرپتوکوکوزیس، بیماری باکتریایی کلیه، سندرم نکروز جلدی اولسراتیو، ساپرولگنیازیس، فرونکلوزیس، آئرومونازیس و نیز سوء تغذیه میزان پروتئین تام و آلبومین سرم کاهش و میزان ALT , AST افزایش می یابد. همچنین در گرسنگی طولانی[2] مدت گلوبولینهای خون نیز کاهش می یابند(Waagbø و همکاران، ۱۹۸۸؛ Rehulka،۲۰۰۲؛ Chen و همکاران ۲۰۰۴، مجابی؛ ۱۳۷۰).

بروز چنین نتایجی در بیماریهای عفونی را می توان ناشی از مکانیزم بیماریزائی عامل بیماری و تاثیر آن بر کبد و یا بروز پاسخهای التهابی و افزایش نفوذ پروتئین به بافت دانست. در موارد بروز گرسنگی طولانی مدت نیز کبد و عضلات مهمترین اندامهای مورد آسیب هستند(Stoskopf و همکاران۱۹۹۳، Johansson و همکاران، ۱۹۷۵).

در بررسی نتایج حاصل از بیو متری ماهیان مشخص گردید که علی رغم اختلاف سنی کم بین دو گروه کفالهای بیمار و سالم صید شده در زمستان اختلاف معنی داری در طول و وزن آنها وجود دارد و ماهیان بیمار به مراتب کوتاهتر و کم وزن تر از ماهیان سالم بودند. همچنین میزان پروتئین تام سرم، آلبومین و IgM بیماران نسبت به ماهیان سالم افت معنی داری را نشان داد. اگر چه تفاوت معنی داری در دو فاکتور C3 و C4 بین بیماران و ماهیان سالم نبود ولی این دو فاکتور کاهش عددی را درمبتلایان نشان داد. با توجه به یافته های فوق به نظر میرسد ماهیان بیمار از یک کاتابولیسم شدید پروتئین رنج میبرند که این مسئله نه تنها در تابلو بیوشیمیایی که در تابلو خونی ماهیان نیز نمایان است. لازم به ذکر است که در تمام منابع بیماری نکروز عصبی را یک بیماری ویروسی حاد دانسته که به سرعت موجب بروز تلفات در بچه ماهیان و ماهیان جوان می گردد لیکن تفاوتهای مشاهده شده در میزان طول، وزن و تابلو خونی این ماهیان یک روند مزمن ناشی از سوء تغذیه طولانی را نشان میدهد و می تواند بیانگر بروز فرم مزمنی از بیماری یا ایجاد نوعی مقاومت نسبی در کفال ماهیان بالغ دریای خزر باشد. خطری که می تواند در آینده این اکوسیستم آبی بزرگ را تهدید نماید تبدیل این ماهیان به حاملین[3] بظاهر سالم ولی حاوی ویروس عامل بیماری است که می تواند در نقل و انتقال عامل بیماری و سرایت آن به گونه های دیگر آبزیان دریای خزربسیار مهم و موثر باشد.

---

[1]- Proteinaemia
[2]- Long term starvation
[3]- Carrier

یکی دیگر از آزمایش های تکمیلی در این پژوهش انجام مطالعات باکتری شناسی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر(ساری) بود که بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، جداسازی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس از تعداد۲۳ عدد ماهی مبتلا از مجموع ۵۶ عدد ماهی بیمار صید شده در فصل زمستان سال ۱۳۸۶ بود.ویبریو آلجینولیتیکوس معمولا جز فلور میکروبی آب دریا بوده و به راحتی از آن جدا میگردد. همچنین بیماریزایی این عامل بیماریزا در کفال مخطط[1] گزارش شده است. مرگ و میر شدید ناشی از حضور این باکتری پس از ایجاد استرس شدید مانند دستکاری غیر اصولی یا تغییرات شدید محیطی گزارش شده است و آن را یک عامل بیماریزای ثانویه می شناسند(Bruke و Rodgers ۱۹۸۱).

با توجه به نتایج حاصل از تابلو خونی ماهیان بیمار به نظر می رسد این افت شدید در فاکتورهای خونی و سرمی و وجود ضعف ایمنی در این ماهیان مهمترین عامل ابتلا ماهیان فوق به این باکتری بوده است و در واقع با توجه به محدود بودن این آلودگی به جمعیت مورد مطالعه می توان آنرا یک عفونت ثانویه در مبتلایان دانست.

در بررسی نتایج سنجش میزان فلزات سنگین در بافتهای مختلف ماهیان کفال با توجه به نتایج فوق هر چند برخی از عناصر مانند سرب تا میزان ۱/۵ppm در عضله تعیین گردید، لیکن در سال های گذشته مقادیر بالاتری از این فلز در کفالهای سالم گزارش شده است. میزان روی، مس و کادمیم نیز زیر مقادیر استاندارد در عضله نشان داده شد. مقادیر حداکثر در سایر بافتهای کفال در گزارشهای مختلف دیده شده است مثلا میزان روی تا بیش از ۱۶۰ppmدر کبد و ۷۶ppm در آبشش نیز دیده شده است. برای نیکل نیز ۶ ppm در کبد و ۵/۷ppm در آبشش برای کفال ماهیان دریای خزر گزارش گردیده است. بنابراین برای بافتهای مختلف غیر از عضله مقادیر متفاوتی از تجمع فلزات سنگین در کفال دریای خزر گزارش گردیده است ولی این تجمع دلیلی بر بروز بیماری این ماهیان نمی تواند باشد (واردی ۱۳۸۹).

با توجه به شرایط فیزیولوزیکی ماهی کفال و دتریت خواری آن، به نظر میرسد بروز ضایعه درسیستم عصبی مرکزی و مرکز کنترل فعالیت های کیسه شنای این ماهی که می تواند ناشی از ابتلا به بیماری نکروز عصبی باشد مانع از شنای طبیعی ماهیان شده و ماهی پس از بروز اختلال در کیسه شنا قادر به حفظ تعادل ، کنترل اعمال حرکتی و تغذیه مناسب نبوده است. براساس مطالعات انجام شده یکی از پیامدهای مهم بیماری نکروز عصبی تلفات شدید می باشد و گزارشی مبنی بر مزمن بودن این بیماری تاکنون در جهان ارائه نشده است. لذا به نظر میرسد چنانچه ماهیان فوق به بیماری نکروز عصبی مبتلا باشند، یا ویروس از حدت بالا برخوردار نبوده و یا کفال ماهیان دریای خزر از یک مقاومت نسبی در مقابل این بیماری برخوردارربوده اند که موجب بروز تلفات گسترده در ماهیان بالغ نشده و روند مزمن در اینگونه ازماهیان ایجاد شده است.

لذا پیشنهاد میگردد برای تشخیص نهایی علت اصلی چنین تغییراتی در تابلو خونی واینکه این نتایج امری اولیه (ناشی از فعالیت ویروس احتمالی) و یا ثانویه (ناشی از تبعات بیماری و اختلال در تغذیه) و نیز ابتلا به عفونت

[1]- Striped mullet

ناشی از ویبریو آلجینولیتیکوس بوده است، امکاناتی برای بررسی روند بیماری نکروز عصبی بصورت تجربی در ماهیان کفال فراهم آید تا ابهامات ایجاد شده در این مورد کاملا برطرف گردد.

در این پژوهش، حضور یا عدم حضور نوداویروس عامل بیماری VNN در ماهیان مولد خاویاری نیز بررسی شد زیرا با توجه به گزارش حساسیت ماهیان خاویاری به نوداویروس و وقوع اولین مورد بیماریVNN بصورت تجربی درماهیان خاویاری (Athanassopoulou و همکاران، ۲۰۰۴) ومجاورت ماهیان خاویاری و کفال ماهیان در دریای خزر، احتمال انتقال افقی بیماری مطرح بوده است لذا بررسی حضور بیماری در مولدین خاویاری دریای خزر ضروری به نظر می رسید. دستورالعمل OIE (۲۰۰۶)، شناسایی ویروس را منوط به جداسازی آن بر روی تیره سلولی SSN-1 و تشخیص ویروس جدا شده به کمک دو روش همزمان پادتن های درخشان غیر مستقیم و RT- PCR می‌داند بنابراین با توجه به عدم مشاهده بروز تلفات و علایم بالینی بیماری در ماهیان خاویاری، ردیابی نوداویروس و آثار آن در مقاطع بافتی با روش های پادتن های درخشان غیر مستقیم، Nested-RT- PCR و آسیب شناسی بافتی انجام شد و سوپرناتانت مغز و چشم تعدادی از نمونه ها بر روی تیره سلولی SSN-1 تلقیح گردید. در مقاطع بافت شناسی مغز و چشم ماهیان، واکوئولاسیون و نکروز در سلولهای عصبی مغز، نخاع و شبکیه چشم ماهیان خاویاری مشاهده نشد. این علایم از مهمترین علایم پاتوگنومونیک بیماری نکروز عصبی ویروسی هستند(Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵؛ Comps و Raynold ،۱۹۹۶؛ Grove و همکاران، ۲۰۰۳)

محققین بسیاری در جداسازی نوداویروس بر روی تیره های سلولی موفق نبوده اند (Breuil و همکاران، ۱۹۹۱ ؛ Mori و همکاران، ۱۹۹۱؛ Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۴؛ Grotmol و همکاران، ۱۹۹۵) به طور کلی تیره های سلولی معدودی برای تکثیر نوداویروس وجود دارد ولی تیره سلولی SSN-1 که از ماهی *Striped snakehead* مشتق شده اولین و موثر ترین تیره سلولی است که توسط OIE و بسیاری از محققین برای جداسازی نوداویروس توصیه شده است (OIE ۲۰۰۶؛ Bovo ،۲۰۰۷؛ Frerichs، ۱۹۹۶). در این تحقیق نیز، بافتهای مغز و چشم ماهیان را در بوته چینی هموژن کرده و پس از فیلتر کردن بر روی تک لایه سلولی SSN-1 تلقیح نموده و در دمای C ° ۲۵ قرار داده شد ولی آثار آسیب سلولی CPE ذکر شده در منابع که شامل گرد، دانه دار و واکوئوله شدن سلولها در مغز و شبکیه چشم است مشاهده نشد. (Iwamoto و همکاران، ۱۹۹۹؛ Chi و همکاران، ۱۹۹۹؛ Bovo، ۲۰۰۷)

تشخیص ویروس به روش پادتن های درخشان غیرمستقیم که مهمترین روش سرولوژی توصیه شده در بسیاری دستورالعملها است با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی ضد نوداویروس ساخت شرکت Aquatic diagnostics انجام شد ولی نقاط طلایی درخشان حاصل از کمپلکس آنتی ژن ویروسی با آنتی بادی و آنتی آنتی بادی فلورسئینه مشاهده نشد. این روش به عنوان یک روش دقیق و حساس برای موارد بالینی بیماری توصیه شده است (OIE، ۲۰۰۶؛ Nguyen و همکاران، ۱۹۹۶؛ Bovo، b ۱۹۹۹؛ Tanaka، ۱۹۹۸).

روش دیگر توصیه شده برای ردیابی نوداویروس روش Nested-RT-PCR است. روش‌های مولکولی با توجه به حساسیت و ویژگی آنها می‌توانند مواد ژنتیکی ویروس را حتی در عفونت های خفیف یا غلظت های کم ویروس ردیابی کنند(Iwamoto و همکاران 2001a & 2001b). بیشتر روش‌های PCR برای تکثیر قطعه کوچکی از RNA_2 که پروتئین کپسید را کد می کند طراحی شده‌اند (Nishizawa و همکاران ۱۹۹۴؛ Thiery و همکاران Dallavalle ; 1999b و همکاران ۲۰۰۰؛ Grotmol و همکاران ۲۰۰۰؛ Skliris و همکاران ۲۰۰۱).

در آزمایش Nested-RT- PCR انجام شده بر روی نمونه های بافتی مغز، چشم، تخمک و اسپرم، RNA کلی بافت به صورت پلت جدا سازی شد و تکثیر قطعه T_4 ژنوم بتانودا ویروس، طبق دستورالعمل کیت IQ2000 انجام شد ولی در هیچیک از نمونه ها باند مثبت مشاهده نشد که این مساله حاکی از عدم وجود ژنوم ویروسی در نمونه های مورد مطالعه می باشد و یا اینکه کیت وارداتی بکار رفته بر روی نمونه های مشکوک ایران فاقد کارائی تشخیصی لازم می باشد. مجموع نتایج، عدم حضور نوداویروس را در بافتهای عصبی و چشم ماهیان خاویاری مورد مطالعه تایید کرد.

عفونت های نوداویروسی در بسیاری مقالات به عنوان بیماری ماهیان آبهای شورعنوان شده و درقاره آسیا نیز موجب تلفات در گونه های مختلف پرورشی دریایی مانند *Sea bass* (Chew-Lim وهمکاران، ۱۹۹۸؛ Glazebrook و همکاران، ۱۹۹۰؛ Munday و همکاران، ۱۹۹۲؛ Renault و همکاران، ۱۹۹۱؛ و Zafran و همکاران (۱۹۹۸) و گروپر(Boonyaratpalin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Chi و همکاران، ۱۹۹۷؛ Danayadol و همکاران، ۱۹۹۵؛ Zafran و همکاران، ۲۰۰۰) گردیده ولی ابتلای ماهیان خاویاری وحشی تاکنون در جهان گزارش نشده است لیکن گزارشات متعددی از انتقال تجربی این بیماری به ماهیان آبهای شیرین و خاویاری وجود دارد که نشان از توانایی بالقوه این بیماری در ایجاد خسارات عمده به صنایع پرورش ماهیان دریایی، سردابی، گرمابی و خاویاری است. (Chi و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ Hedge و همکاران، ۲۰۰۳؛ Munday و همکاران، ۲۰۰۲) بروزبیماری در کفال ماهیان دریای خزرکه ماهیان لب شورهستند می‌تواند نشانه تغییر گستره میزبانی ویروس از ماهیان آبهای شور به ماهیان آبهای لب شور یا حتی شیرین باشد و ممکن است در آینده شاهد درگیری ماهیان خاویاری وحشی و حتی ماهیان آب شیرین باشیم. به همین دلیل بررسی حساسیت سایر گونه ها بویژه ماهیان خاویاری ضروری است. بنابراین در ادامه این تحقیق، مواجه سازی بچه ماهیان قره برون با نوداویروس جداشده از کفال ماهیان انجام شد که بروز شنای نامتعادل، بی حالی، اتساع محوطه شکمی، مرگ و واکوئولاسیون واضح در مقاطع بافت شناسی نشان از ابتلای ماهیان مورد آزمایش به نوداویروس است. مرحله تایید تشخیص در آزمایشگاه رفرانس ایتالیا با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد نوداویروس به روش ایمونوهیستوشیمی نیز صورت گرفت که نتایج آن نیز منفی گزارش گردید.

هرچند در این مطالعه موارد ابتلای طبیعی بیماری نکروز عصبی ویروسی در مولدین وحشی دیده نشد اما ایجاد شکل تجربی بیماری در آزمایشگاه با در نظر گرفتن مجاورت این ماهیان با کفال ماهیان در دریای خزر احتمال

انتقال بیماری را به ماهیان خاویاری ممکن می کند. چه بسا موارد طبیعی بیماری در دریای خزر پیش از مشاهده شدن توسط صیادان، توسط صیادان طبیعی در دریا مصرف شده یا به طریق دیگری حذف می شوند. از طرفی در بسیاری از مقالات بیشترین میزان شیوع و تلفات بیماری نکروز عصبی ویروسی در مراحل لاروی و بچه ماهیان گونه های دریایی است که در صورت بروز آن در لارو ماهیان خاویاری وحشی بسادگی قابل مشاهده نبوده و تنها می توان در بلند مدت تاثیر آن را در ذخایر دریای خزر مشاهده کرد. ذخائری که بر اساس اطلاعات موجود روند کاهشی در دریای خزر در پیش گرفته است. لذا برای درک بهتر پراکنش طبیعی بیماری و اتخاذ استراتژی مناسب کنترل بیماری در آینده بهتر است که بررسی های مستمر اپیدمیولوژیکی در ماهیان خاویاری صورت گرفته و برای اطمینان از حفظ ذخایر پاک نسبت به پرورش مولدین خاویاری غیر آلوده اقدام گردد.

در خصوص چرایی علل بروز بیماری VNN در دریای خزر فرضیه های متعددی وجود دارد. دریای خزر از نظر آبی با دریای بالتیک، دریای سفید و دریای سیاه از طرق شبکه گسترده ای از راه های آبی داخلی آنها مرتبط می باشد که مهمترین آنها رود ولگا می باشد. آبهای توازنی[۱] حاصل از کشتی هائی که میان دریای سیاه و دریای خزر از طریق این آبراهها در تردد می باشند می توانند منشا انتقال عوامل بیماریزا به دریای خزر باشند.

انتقال افقی ویروس عامل بیماری VNN از طریق زئوپلانکتونها به عنوان ناقل مکانیکی و از طریق آبهای توازنی می تواند صورت پذیرد. این فرضیه توسط Skliris و همکاران در سال ۱۹۹۸ مورد آزمون قرار گرفت. آنها در بررسی های خود مشخص نمودند که زئوپلانکتونهائی همچون Brain shrimp (*Artemia salina)* و Rotifer *(Brachionus plicatilis)* می توانند به عنوان ناقل نوداویروس عمل کنند. این فرضیه در خصوص ویروس KHV[۲] نیز به اثبات رسیده است(Minamoto و همکاران، ۲۰۱۰). این محققین اعلام نمودند که ویروس KHV می تواند در روتیفر باقی بماند و ارتباط مثبت معنی داری میان تعداد روتیفرها و این ویروس به اثبات رسید. از این نتایج آنها پیشنهاد دادند که پلانکتونها می توانند بر روی اکولوژی ویروسی در محیط های طبیعی اثر گذار باشند. در تحقیق مشابهی که توسط(Nerland و همکاران، ۲۰۰۷) صورت گرفت آنها انتقال نوداویروس ها را از طریق آب های دریائی به اثبات رساندند. مشابه همین معضل، در سالهای اخیر موضوع آبزی Comb jelly یا همان شانه دار مزاحم *(Mnemiopsis leidyi)* بود که در سالهای اخیر از طریق آبهای توازنی کشتی ها از سایر محیط های دریائی به دریای خزر وارد شد(Galina و همکاران، ۲۰۰۶). در این سالها جمعیت این گونه مهاجم در این دریا افزایش یافت و بر روی جوامع زئوپلانکتون ها اثرات مخربی بر جای گذاشته است و هنوز بعد از سالها هنوز راه حل مناسبی برای رفع این معضل زیست محیطی یافت نشده است.درواقع یکی از مشکلات بزرگ کنونی دریای خزر مربوط به وجود شانه دار *Mnemiopsis leidyi* می باشد که سبب اختلال در اکوسیستم محیط شده و تأثیرات مستقیم و غیرمستقیم آن بر اکوسیستم محیط به شرح ذیل می باشد:

---

[۱]-Ship's Ballast water
[۲]-Koi Herpes Virus

- کاهش بیوماس و تراکم زئوپلانکتون ها
- افزایش بیوماس و تراکم فیتوپلانکتون ها
- تغییر در تراکم و بیوماس جمعیت های مختلف پلانکتونی
- حذف غالبیت برخی از گونه های زئوپلانکتونی
- افزایش میزان مواد آلی بستر TOM
- افزایش میزان مواد بیوژن
- سیر تکاملی دریا بسوی آتروفی شدن
- احتمال وقوع بلوم جلبکی در مناطق مصبی رودخانه ها
- برهم زدن شبکه یا زنجیره غذائی اکوسیستم
- تغذیه از لارو و تخم ماهیان دریائی
- تغذیه مستمر از زئوپلانکتون ها
- رقیب غذائی با ماهیان زئوپلانکتون خوار
- پراکندگی وسیع در حوزه جنوبی دریا
- زمستان گذرانی در حوزه جنوبی بدلیل وجود دمای مناسب
- اختلال در صید و گرفتگی تورهای صیادی
- کاهش میزان صید کیلکاماهیان

از سوی دیگر بیش از ۱۲۰ گونه ازماهیان دریائی در دریای خزر زندگی می کنند ولی چرا وقوع نلفات ناشی از VNN فقط در کفال ماهیان گزارش شده است؟ خصوصیات فیزیولوژیک کفال ماهیان می تواند حساسیت این گونه را به ابتلای این ماهی به VNN تشریح نماید. خصوصیات احتمالی که این گونه را به ابتلای به این بیماری مستعد می سازد. مشابه همین وضع در میان قریب ۴۰ گونه حساس به این بیماری جهان گستر از میان هزاران گونه از ماهیان دریائی وجود دارد که نمایانگر آن است که نوداویروس نیازهای اختصاصی جهت تکثیر و بیماریزائی خود در گونه های حساس دارد از جمله گیرنده های اختصاصی درسطح سلول های هدف که در گونه های حساس وجود دارد.در تحقیقی که توسط Ucko و همکاران در سال ۲۰۰۴ منتشر گردید مشخص شده است که ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) که به خانواده کفال ماهیان تعلق دارد در دریای سرخ به این بیماری مبتلا گردیده است . نکته جالب توجه در آن است که در سالهای مورد مطالعه (۲۰۰۲- ۱۹۹۸) وقوع بیماری در پنج گونه مهم اقتصادی در دریای سرخ و سواحل مدیترانه توسط محققین یاد شده، بصورت همزمان وقوع بیماری در کفال ماهیان دریای خزر نیزتوسط تیم محققین ایرانی آغاز شده بود (سال۲۰۰۳ در سواحل زیبا کنار انزلی) و گزارش تایید وقوع بیماری نیز دو سال بعد منتشر گردید (ذریه زهرا و همکاران، ۲۰۰۵) . نکته

جالب توجه در آن است که ویروس عامل بیماری در هر دو مورد از نظر فیلوژنیکی مشابه هم بوده و هر دو به ژنوتایپ RGNNV تعلق داشته است.

همانگونه که قبلا نیز ذکر شده بود دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک در اصل جز ماهیان بومی دریای خزر نبوده اند بلکه طی سالهای ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ (۱۳۱۳ – ۱۳۰۹ شمسی) توسط روس ها از دریای سیاه به دریای خزر پیوند زده شدند. طی این سالها بچه ماهیان سه گونه کفال طلایی، پوزه باریک و کفال مخطط یا خاکستری از دریای سیاه به دریای خزر آورده شدندکه پیوند دو گونه طلایی و پوزه باریک بخاطر گرمتر بودن آب دریای خزر نسبت به دریای سیاه، منابع غذایی مناسب و نیز وجود مناطق کم عمق تر که مورد پسند این ماهیان برای زندگی است موفقیت آمیز بود و در مدت کوتاهی بخوبی با شرایط اکولوژیکی دریای خزر سازگار شدند و از پراکنش خوبی نیز برخوردار گردیدند. نکته حائز اهمیت آن است که گونه کفال خاکستری نیز در آبهای جنوب ایران وجود داشته و از منابع مهم شیلاتی در مناطق جنوبی کشور محسوب می شود و گزارش ابتلای آن به این بیماری در دریای سرخ، بایستی از سوی مسئولین شیلاتی کشور مورد توجه ویژه قرار گیرد. بنابراین مطالعات اپیدمیولوژیکی در خصوص میزان وقوع و گسترش عامل بیماری، چرخه زندگی ویروس و منشا انتقال بیماری در منطقه بسیار ضروری است.

از سوی دیگر در سواحل مختلف دریای خزر، چه در سواحل جنوبی و چه سواحل شمالی مزارع پرورش ماهی گوناگونی فعالیت دارند. اغلب این مزارع از پودر ماهی در تغذیه ماهیان خود استفاده می کنند که در تولید آن از تراشه ماهیان مخلوط با روغن ماهی استفاده می شود. این پودر ماهیان می تواند از ماهیان احتمالا آلوده به VNN در مناطق آلوده ساخته شود. جداسازی بتانوداویروس عامل بیماری VNN ازتراشه ماهیان توسط Gomez و همکاران در سال ۲۰۱۰، فرضیه انتقال بیماری از طریق تراشه ماهیان را تقویت می نماید.

به علاوه تخلیه آب از مزارع آلوده که بصورت مستمر به طرف دریای خزر جریان دارد می تواند یکی دیگر از راههای احتمالی گسترش ویروس در دریای خزر باشد. نمونه برداری و انجام آزمایشات تشخیصی RT- PCR از موادغذائی و پودر ماهی های وارداتی و آب های تخلیه شده در دریای خزر به منظور تایید این فرضیه و به عنوان یک هدف تحقیقاتی جدید پیشنهاد می گردد.

از سوی دیگر در سالهای اخیر به دلیل افزایش آلودگی های مرداب انزلی در استان گیلان ، با تخلیه مستمرپساب های مختلف و سرازیرشدن آن به دریای خزر روبرو بوده ایم که بالنتیجه با تغییرات رسوبات و فون بنتونیک در کف دریای خزر در سواحل جنوبی همراه بوده است و از آنجا که کفال ماهیان دیتریت خوار می باشند و از رسوبات آلوده ای ممکن است تغذیه نمایند که با ذرات ویروسی آلوده شده اند و بالطبع بیماری در کفال ماهیان حادث می شود و این فرضیه ای است که در علل چرائی آلودگی کفال ماهیان طی سال های اخیر مطرح می گردد.

میزان صید کفال ماهیان طی سالهای ۱۳۷۷ لغایت ۱۳۸۵ روند متغیری داشته و از ۴۵۵۸ تن در سال ۱۳۷۷ به مقدار ۶۸۷۳ تن در سال ۱۳۸۱ رسید ولی نگاهی به آمار صید کفال ماهیان نشان می دهد که از سال ۱۳۸۱ به بعد تا سال ۱۳۸۵ روند صید در دریای خزر اندکی با افزایش روبرو بوده و از سال ۱۳۸۵به بعد همچنان روند نزولی داشته است و به کمترین میزان خود طی سالهای اخیر رسیده است. در سالهای اخیر ترکیب گونه ای کفال ماهیان طی سالهای ۸۶ـ۱۳۷۶ نیزتغییرات قابل ملاحظه ای داشته و سهم کفال طلایی از ۶۷/۷ درصد در سال ۱۳۷۶ به بیش از ۹۹ درصد در سال ۱۳۸۶ رسید و سهم کفال پوزه باریک در ترکیب گونه ای صید کفال ماهیان روند نزولی داشته و به زیر یک درصد رسیده است. که می تواند بدلیل هجوم شانه دار مهاجم به دریای خزر و تغذیه از تخم و لارو این ماهی و یا ایجاد رقابت غذائی با آن باشد.(آمار بخش مدیریت ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران)

با مروری بر مطالعات انجام شده وآمار و اطلاعات موجود در برنامه راهبردی محصولی ماهیان استخوانی و کیلکا، می توان گفت که ترکیب گونه ای ماهیان استخوانی در چند دهه اخیر شدیداً تغییر یافته است و هم اکنون فقط سه گونه ماهی سفید، کفال طلائی و ماهی کپور غالبیت ترکیب صید را دارا می باشند. با توجه به تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان سفید، وضعیت صید و ذخایر این گونه بهبود نسبی یافته است و از ذخایر سایر گونه های مهم و اقتصادی نظیر ماهی ماش، سیم، سس ماهی و ... بطور قابل ملاحظه ای کاسته شده است. متأسفانه اقدام جدی برای احیاء ذخایر سایر گونه ها انجام نشده است.سه گونه اصلی ماهی سفید ، کفال ماهیان و ماهی کپور دریائی همواره سه گونه اصلی صید ماهیان استخوانی دریای خزر را بر عهده داشته اند.

در یک مطالعه موردی که از شهریور ۱۳۷۹ تا پایان مرداد سال ۱۳۸۰، جهت ارزیابی صید ماهیان استخوانی در خلیج گرگان انجام شد، در این تحقیق برای صید ماهیان استخوانی از روش دام گستر استفاده شد و چشمه‌های ۲۲، ۲۸، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۵۴ میلیمتر مورد استفاده قرار گرفت. در ترکیب صید دامهای تحقیقاتی هفت گونه از ماهیان استخوانی شامل ماهی سفید، کفال، کلمه، کپور، شگ ماهی، شاه کولی و گاو ماهی مشاهده شد. در بررسی ترکیب صید صیادان غیرمجاز فعال در این منطقه علاوه بر گونه‌های مذکور اردک ماهی و ماهی سوف نیز مشاهده شد.

طی این مدت ۱۲۹۶ رشته دام در خلیج گرگان مستقر شد که حاصل آن صید ۱۵۶۱ کیلوگرم از هفت گونه ماهیان استخوانی مذکور بود. میزان صید در واحد تلاش (یک رشته دام در روز) برای کل ماهیان استخوانی ۱/۲ کیلوگرم محاسبه گردید. بیشترین میزان صید با ۵۵۷ کیلوگرم مربوط به کفال ماهیان بوده و ماهی کپور و ماهی سفید به ترتیب با ۴۴۰/۴ و ۲۶۹/۸ کیلوگرم بیشترین میزان صید را داشتند. کفال ماهیان که ۳۵/۷ درصد از ترکیب صید را داشتند شامل دو گونه کفال پوزه باریک و کفال طلایی بودند که به ترتیب ۴۲/۳ و ۵۷/۷ درصد از ترکیب صید کفال ماهیان را بخود اختصاص دادند.

ولی در حال حاضر بر اساس آمار موجود بیشترین میزان صید ماهیان استخوانی دریای خزر مربوط به ماهی سفید می باشد که می تواند ناشی از افزایش برنامه های بازسازی ذخائر این گونه و افزایش میزان رهاکرد بچه ماهیان سفید تولیدی در مراکز تکثیرطی سالهای اخیر باشد ولی از سوی دیگر میزان صید کفال ماهیان در دریای خزر (بویژه گونه کفال پوزه باریک) رو به کاهش نهاده است که با عنایت به اینکه بازسازی ذخایر کفال ماهیان کاملاً وابسته به تکثیر طبیعی در محیط دریای خزر می‌باشد و هیچ گونه اقدامی برای تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان برای این گونه‌ها انجام نمی شود لذا ضرورت توجه جدی به میزان ذخائر کفال ماهیان به عنوان ذخائر ارزشمند و منحصر به فرد دریای خزر بیش از پیش از سوی مسئولین شیلاتی کشور اجتناب ناپذیر است.

پیشنهادها

با توجه به گزارشهای متعددی که از انتقال تجربی این بیماری به ماهیان آبهای شیرین و خاویاری وجود دارد که همگی حاکی از توانایی بالقوه این بیماری در ایجاد خسارات عمده به صنایع پرورش ماهیان دریایی، سردابی، گرمابی و خاویاری می باشد. به همین دلیل بررسی حساسیت سایر گونه ها بویژه گونه های پرورشی رایج در کشور نیز ضروری به نظر می رسد. ماهی شانک و هامور ماهیان ، ماهی آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*) ، از گونه های جدید پرورشی آبهای شور هستند که در سالهای اخیر به گونه های پرورشی کشور اضافه شده‌اند و به بیماری نکروز عصبی ویروسی نیز بسیار حساس بوده و به عنوان اولین دسته از ماهیان پرورشی کشور در معرض خطر می باشند. از طرفی با توجه به انتقال تجربی بیماری به برخی از ماهیان آب شیرین ممکن است که این بیماری بتواند به صنایع پرورش ماهیان گرمابی و سردابی کشور انتقال یافته و آنها را با خطر روبرو سازد ضمن آنکه اطلاعات موثقی از بروز این بیماری مهلک در میان ماهیان سردآبی در کشورهای اروپائی همچون نروژ وجود دارد.

کمبود اطلاعات اپیدمیولوژیک و دانش محدود در مورد مکانیزم های بیماریزایی این بیماری یکی از موانع موثر در کنترل بیماری است. به همین دلیل باید رویکرد چند جانبه اتخاذ گردد که شامل اقدامات سختگیرانه بهداشتی و اقدامات پیشگیری، کنترل و آزمایش مستقیم همه ماهیان مولد و حذف حاملین می باشد. لذا برای درک بهتر مکانیزم های بیماری و اتخاذ استراتژی مناسب کنترل بیماری در آینده بهتر است که بررسی های اپیدمیولوژیکی و ژنوتیپیکی نوداویروس در ایران در تمامی گونه های با ارزش شیلاتی پرورشی و وحشی آبهای شور و شیرین انجام شود. به منظور کنترل، پیشگیری و اقدامات بنیادی در جهت مبارزه با گسترش و انتشار بیماری در سایر جوامع آبزی کشور برنامه ها و اقدامات اساسی ذیل پیشنهاد می گردد:

۱. ادامه مطالعات فعلی به منظور خالص سازی ویروس عامل بیماری و انجام آزمایشات آنالیز سکانس به منظور تعیین ساختار فیلوژنیکی ویروس موجود در دریای خزر.
۲. آغاز مطالعات و برنامه ریزی لازم جهت ساخت کیت تشخیص سریع بیماری به روش های مولکولی RT-PCR و Nested PCR و Real time PCR
۳. انجام آزمایشات تکمیلی RT- PCR و Nested PCR بر روی پلانکتون ها و روتیفر ها و بچه ماهیان حساس دریای خزر به منظور تعیین و شناسائی چرخه زندگی (Life Cycle) ویروس موجود در دریای خزر با استفاده از گشت های دریائی سالیانه.
۴. انجام مطالعات و بررسی های اپیدمیولوژیکی و ژنوتیپیکی نوداویروس در سواحل شمالی ایران با همکاری محققین کشورهای منطقه.

۵. تدوین یک طرح جامع به منظور ادامه مطالعات و بررسی های تشخیصی در خصوص ماهیان دریائی جنوب با توجه به تلفات اخیر ماهیان گاریز(*Liza klunzingeri*) در سواحل بندرعباس.
۶. کنترل و آزمایش مستقیم همه ماهیان مولد و حذف حاملین مبتلا از جمعیت های آبزیان دریائی و پرورشی بویژه در مراکز تکثیر ماهیان دریائی.
۷. انجام مطالعات لازم به منظور ساخت واکسن مناسب علیه عامل این بیماری در جهت ارتقای سیستم ایمنی ماهیان مولد و بچه ماهیان رهاسازی شده از مراکز باز سازی ذخائر ماهیان دریائی کشور

امید آنکه با توجه بیشتر همه مسئولین دلسوز به اهمیت خسارات اقتصادی ناشی از بروز این بیماری نوظهور در عرصه های شیلاتی کشور و تخصیص اعتبارات مناسب جهت ادامه مطالعات بنیادی و کاربردی، بتوان با بهره گیری از همه پتانسیل و توان علمی کشور و نیز اساتید و مشاورین بین المللی با جنبه های بیشتری از این بیماری جهان گستر آشنا شد و با توجه به عدم کارائی کیت های تجاری وارداتی با ساخت کیت تشخیص سریع این بیماری بتوان به چرخه زندگی این ویروس و ناقلین احتمالی و راه های بقا و انتقال این ویروس در طبیعت آبهای دریائی و داخلی کشور پی برد و با شناسائی جنبه های اپیدمیولوژیک و ژنوتیپیکی نوداویروس موجود در ایران و با اتخاذ استراتژی مناسب بتوان برنامه های اساسی در جهت کنترل و پیشگیری بیماری در عرصه های شیلاتی کشور تدوین نمود و اقدامات بنیادی در جهت مبارزه با گسترش و انتشار بیماری در میان تمامی گونه های با ارزش شیلاتی پرورشی و وحشی آبهای شور و شیرین کشور ارائه داد.

تشکر و قدردانی

در انجام این تحقیق عزیزان بسیاری سهیم بوده و مشارکت فعال داشته اند که وظیفه خود می دانم از تمامی این عزیزان که با تلاش شبانه روزی خود موجبات ثمردهی این بررسی علمی را فراهم نمودند صمیمانه سپاسگزاری نمایم و توفیق روزافزون آنان را از خداوند متعال خواستارم.

از زحمات و تلاش های شبانه روزی مجریان محترم استانی ، برادر بزرگوار آقای دکتر محدث قاسمی و خواهران ارجمند سرکار خانم دکتر مریم قیاسی و سرکار خانم دکتر سمیه حقیقی کارسیدانی که با حوصله و دلسوزی، پشتکار و دقت علمی زحمات بسیاری در جهت انجام نمونه برداری، عملیات آزمایشگاهی و پیگیری امور اجرائی طرح ملی عهده دار شدند و نیز کلیه همکاران تیم تحقیقاتی این طرح ملی، خالصانه تقدیر و تشکر می گردد.

از همکاران عزیز بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، مدیریت های امور مالی و طرح و برنامه موسسه تحقیقات شیلات ایران و عزیزان همکار و روسای قبلی و فعلی سه مرکز تحقیقاتی شمال ایران شامل پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر(ساری)، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی(انزلی) و انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) صمیمانه تقدیر و تشکر می گردد.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر مهدی سلطانی، دکتر عباس برین و آقای مهندس هادی باقری و برادر صیدانلو کارشناسان دپارتمان بهداشت و بیماری های آبزیان و سایر عزیزان و کارکنان پر تلاش دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

همچنین از اساتید مشاور و بین المللی این بررسی ، Prof.G.Bovo از Istituto Zooprofilattico و مرکز رفرانس بیماری VNN ازکشور ایتالیا ، Prof.T. Nakai از دانشگاه هیروشیما و مرکز رفرانس بیماری VNN در کشور ژاپن و Prof. Chi Shau Chi از دانشگاه ملی کشور تایوان که همگی از ابتدای این تحقیق در انجام آزمایشات تشخیصی و ارسال اطلاعات مورد نیاز صمیمانه همکاری نمودند و نیز Prof. Igor Shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (ARRIFF) از کشور روسیه و Dr.Hassan Hj. Mohd Daud از دانشکده دامپزشکی دانشگاه UPM کشور مالزی، به پاس محبت های همیشگی این بزرگواران ، تقدیر و تشکر می گردد.

از زحمات دانشجوی سخت کوش آقای دکتر علیرضا نظری در مراحل انجام آزمایشات بیماریزائی و میکروسکوپ الکترونی طرح ملی نیز صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

از سرکار خانم دکتر پروانه صیفوری و جناب آقای دکتر جمال نجفی و برادر دکتر نیازی و کلیه همکاران پرتلاش مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور تشکر و قدردانی می گردد.

ازجناب آقای دکتر عباس نوری از بخش میکروسکوپ الکترونی و کارکنان پر تلاش بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی نیزصمیمانه سپاسگزاری می گردد.

توفیق روزافزون کلیه همکاران ارجمند را از ایزدمنّان مسئلت داریم.

منابع

۱. اصلان پرویز. ح، (۱۳۷۰)، کفال ماهیان دریای خزر، ماهنامه آبزیان، ۱۴، ص ۲۵ – ۲۰

۲. بینایی.م، قیاسی. م، ذریه زهرا. ج، باهنر. (۱۳۸۶)، بررسی فاکتورهای هماتولوژی و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی ماهی کفال طلایی حوزه جنوبی دریای خزر، دومین همایش بین المللی علوم زیستی، ص ۱۲۳

۳. خسروی راد. ح، (۱۳۷۳)، بررسی مقدماتی کشت توام ماهی کفال و کپور ماهیان چینی در آب شیرین، شرکت سهامی شیلات ایران، اداره کل شیلات استان مازندران، ۶۹ ص.

۴. دریا نبرد. غ.م، (۱۳۸۷)، مطالعه خصوصیات تولید مثلی ماهی کفال طلایی (*Liza auratus*) در سواحل جنوبی دریای خزر استان مازندران، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۵. دریانبرد. غ.م، عبدالملکی. ش، بندانی. غ، کر. د، (۱۳۸۷)، ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر(۸۶ – ۱۳۸۴)، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ۱۸۰ ص.

۶. ذریه زهرا، م.ج،(۱۳۸۳)، گزارش تخصصی وقوع اولین مورد بیماری نکروز عصبی ویروسی(VER / VNN) در ماهیان کفال طلایی(Golden grey mullet)، ۳۵ صفحه.

۷. دریای مازندران " سعیدی. ع. ا، قیاسی. م، حبیبی. ف، بینایی. م، الیاسی. ف، (۱۳۸۴)، بیماری نوظهور کفال ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر و خطرات اکولوژیک ناشی از آن، ششمین همایش علوم و فنون دریای و اولین همایش آبنگاری ایران، ص ۸۸

۸. سلطانی. م، رهاننده. م، (۱۳۸۰)، گزارش عارضه نفخ در کفال ماهیان دریای خزر، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱، دوره ۵۶، ص ۱۰۶ – ۱۰۵

۹. سلطانی. م، شریف پور. ع، قیاسی. م،(۱۳۸۳)، جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی در ماهی، فصل نهم،ص ۶۷ – ۴۶

۱۰. شریف پور.ع، ذریه زهرا.ج، (۱۳۸۴)، آسیب شناسی بیماری نوظهور نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) در ماهیان کفال طلایی (*liza auratus*) دریای خزر، چهارمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران(ارومیه).

۱۱. شعبانی. خ، لالوئی. ف، افرایی. م، (۱۳۷۴)، بررسی زمان تولید مثل و هماوری گونه ماهی کفال اوراتوس در سواحل جنوبی دریای خزر (استان مازندران). مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران، ۸ ص.

۱۲. طبرستانی،م.(۱۳۸۴)، خونشناسی پزشکی،انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد،۵۶۷صفحه

۱۳. عامری مهابادی. م،(۱۳۷۸)، روشهای آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی ، انتشارات دانشگاه تهران،۹۳ صفحه-صفحه ۳۸-۱۰.

۱۴. فغانی ،ط.،(۱۳۸۵)، پایان نامه کارشناسی ارشد اثر ارگوسان Aquavac Ergosan و واکسن Aauavac Garvetil بر فاکتورهای رشد ،بازماندگی ،تحریک سیستم ایمنی و رویارویی با باکتری استرپتوکوک در قزل الای رنگین کمان ،۱۲۳صفحه .

۱۵. کیمرام. ف، (۱۳۸۸)، برنامه راهبردی محصولی ماهیان استخوانی و کیلکا، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۱۶ صفحه.

۱۶. مجابی. ع، (۱۳۷۰)، بیوشیمی درمانگاهی دامپزشکی، انتشارات جهاد دانشگاهی، ۳۷۲ صفحه

۱۷. مدیریت ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران،(۱۳۸۸) ، آمار صید کفال ماهیان تا سال ۱۳۸۷

۱۸. واردی. س. ا، غلامی پور. س، فارابی.م. و، پورنگ. ن، (۱۳۸۹)، ارزیابی میزان تجمع کادمیوم و سرب در بافت خوراکی ماهیان استخوانی دریای خزر، اولین همایش ملی منطقه ای اکولوژی دریای خزر، صفحه ۱۰۷

19. Adachi K, Ichinose T, Watanabe K, Kitazato K, Kobayashi N.(2008). Potential for the replication of the betanodavirus redspotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines. Archive Virology; 153(1):15-24.
20. Anonymous, (1995). Viral encephalopathy and retinopathy, In: Diagnostic Manual for Aquatic Animal Disease. Office International des Epizootics, pp: 85 – 90
21. Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K. & Furusawa I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Fish Pathol*., 27: 191-195.
22. Arimoto M., Mori K., Nakai T., Muroga K. & Furusawa I. (1993). Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis*., 16: 461-469.
23. Arimoto, M., Maruyama, K., Furusawa, L., (1994). Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack, Fish Pathol. 19-24
24. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., Furusawa, I., (1996). Effect of chemical and physiological treatment on the inactivation of striped jack nervous necrosis (SJNNV), Aqaculture, 143, 15 – 22
25. Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V. & Karipoglou K. (2003). Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J. Fish Dis*., 26: 361-365.
26. Azad I.S., Shekhar M.S., Thirunavukkarasu A.R., Poornima M., Kailasam M., Rajan J.J.S., Ali S.A., Abraham M. & Ravichandran P. (2005). Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. *Dis. Aquat. Org*., 63: 113-118.
27. Banu.G.R, Nakai.T, (2004). Inoculation of BALB/c mice with fish-pathogenic nodavirus, J. Comp.Path, vol.130, 202 – 204
28. Barker D.E., MacKinnon A.M., Boston L., Burt M.D.B., Cone D.K., Speare D.J., Griffiths S., Cook M., Ritchie R. & Olivier G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org*., 49: 99-105.
29. Bellance R. & Gallet de Saint-Aurin D. (1988). L'encéphalite virale du loup de mer. Caraibes Medical: 105-114.
30. Beraldo P., De Nigris G., Rogato F. & Galeotti M. (2007). Histological and immunohistochemistry findings of viral encephalopathy-rethinopathy in gilthead seabream larvae (Sparus aurata, L. 1578) reared in Italy. 13th International Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Grado (UD) - Italy, 17-22 September 2007: 140.

31. Binaii M., Ghiasi M., Zorriehzahra M.J., Bahonar A.R. (2008). Evolution of hematological and some biochemical and immunological factors of golden grey mullet (*Liza auratus*) from southern Caspian Sea (Golestan province). Book abstract of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Florence, Italy p: 75.
32. Binaii M., Ghiasi M., Pourgholam R., Zorriehzahra M.J., Saidi A.A., Behrozi Sh. (2010) Comparison study on Hemathological Factors between health and suspected Golden grey mullet *Liza auratus* in Mazandaran Province. 16th Iranian Veterinary Congress, Tehran, Iran.
33. Bloch B., Gravningen K. & Larsen J.L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. Dis. Aquat. Org., 10: 65-70.
34. Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J. & Hoffmann R. (1996). Picorna-like virus associated with mortality and a spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus. Dis. Aquat. Org*., 26: 75-80.
35. Bovo G., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F. & Comuzzi M. (1996). Viral Encephalo-retinopathy of reared sea bass: first detection in Italy. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 19: 52-64.
36. Bovo G., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Rosin R. & Montesi F. (1999b). A rapid and efficient method for diagnosing viral encephalo-retinopathy in symptomatic specimens. *9th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Rhodes (Greece), 19-24 September 1999*: Poster 162.
37. Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Matinelli, F., Montesi, F., De Mas, S., (1999). Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy, Virus Research, 63, 143 – 146
38. Bovo G., (2007). Monography of ethiopathology of Viral encephalopathy and retinopathy, Istituto Zooprofilattico), Italy, 4: 93-146
39. Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F. & Pichot Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97: 109-116.
40. Breuil G., Pepin J.F., Boscher S. & Thiéry R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broofish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis*., 25: 697-702.
41. Bruke. J, Rodgers. L, (1981). Identification of pathogenic bacteria associated whit occurrence of "red spot" in sea mullet, *Mugil cephalus*, in south-eastern Queensland, Journal of Fish Diseas, 3, 153 – 159.
42. Buchan, K.A.H., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J, Mackinnon, A.M., Boston, L., (2006). The efficacy of ozonated sea water for surface disinfection of haddock(*Melanogrammus aeglefinus*) eggs against piscine nodavirus, Aquaculture engineering, 35, 102 – 107
43. Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. & Wickner R.B. (2000). Virus Taxonomy. Academic Press, San Diego.
44. Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. & Chen S.N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis*., 20: 185-193.
45. Chi, S.C., Hu, W.W., Lo, B.J., (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF - 1) derived from grouper, *Epinephelus coides*, (Hamillton): a cell line susceptible to grouper nervous virus(GNNV). J. Fish Dis, 22, 173 – 182.
46. Chi, S.C., Lin, S.C., Su, H.M., Hu, W.W., (1999). Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and grouper larve, Viral Recearch, 63, 107 – 114
47. Chi S.C., Lee K.W. & Hwang S.J. (2001). Investigation of host range of fish nodavirus in Taiwan. *In: 10th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Dublin (Ireland), 9-14 september 2001*: Abstract 0-49.
48. Chi S.C., Shieh J.R. & Lin S.J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org*., 55: 221-228.
49. Chi S.C., Wu Y.C. & Cheng T.M. (2005). Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org*., 65: 91-98.
50. Chua F.H.C., Loo J.J. & Wee J.K. (1995). Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating enecphalopathy and retinopathy. *In : M. Shariff, J.R. Arthur and P. Subhasinghe, Editors, Diseases in Asian Aquaculture II, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila*: 235-241.
51. Clauss. T. M, Dove. A. D. M, Arnold. J. E, (2008). Hematological disorder of fish, Vet. Clin Exotic Anim, 11, 445 – 464.

52. Comps M. & Raymond J.C. (1996). Virus-like particles in the retina of the sea-bream, *Sparus aurata. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*., 16: 161-163
53. Comps M., Trindade M. & Delsert C. (1996). Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. Aquaculture; 143: 113-121.
54. Curtis P.A., Drawbridge M., Iwamoto T., Nakai T., Hedrick R.P. & Gendron A.P. (2001). Nodavirus infection of juvenile white sea bass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *J. Fish Dis*., 24: 263-271.
55. Curtis, P.A., Drawbridge, M., Okihiro, M.S., Nakai, T., Hedrick, R.P., Adkison, M., (2003). Viral nervous necrosis (VNN) in white sea bass, *Atractoscion nobilis*, Cultured in southern California and implications for marine fish aquaculture, Ocens, vol.3, Issu 22 – 26, 1448 – 1453.
56. Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P. & Colombo L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis*., 23: 321-327.
57. Dalla Valle, L., Toffolo,V., Lamprecht. M, Maltese. C, Bovo. G, Belvedere. P, Colombo. L, (2005). Development of a sensitive and quatitative diagnostic assay for fish nervous virus based on two – target real – time Pcr, Vet. Microbiology, 110, 167 – 179
58. Danayadol Y., Direkbusarakom S. & Supamattaya K. (1995). Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. *In: Shariff M., Arthus J.R., Subasunghe R.P. (eds). Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health section, Asian Fisheries Society, Manila*: 227-233.
59. Dannevig B.H., Nilsen R., Modahl I., Jankowska M., Taksdal T. & Press C.McL. (2000). Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. Dis. Aquat. Org., 43: 183-189.
60. De Mas S., Vicari N., Pellati D., Bertazzo V., Bovo G., Borghesan F., Montesi F., Mutinelli F., Dalla Valle L. & Tisato E. (1998). RT-PCR technique application for seabass (*Dicentrarchus labrax*) viral encephalo-retinopathy diagnosis. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 23: 11-23.
61. Freriches, G.N., Rodger, H.D, Perie, Z., 1996, Cell culture isolation of piscine neuropathology nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrachus labrax*, J. Gen. Virol. 77, 2067 – 2071.
62. Fukuda Y., Nguyen H.D., Furuhashi M. & Nakai T. (1996). Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. Fish Pathol., 31, 3: 165-170.
63. Furusawa R., Okinaka Y & Nakai T. (2006). Betanodavirus infection in the freshwater model fish medake (*Oryzias latipes*). *J. General Virol.*, 87: 2333-2339.
64. Gagnè N., Johnson S.C., Cook-Versloot M., MacKinnon A.M. & Olivier G. (2004). Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Dis. Aquat. Org*., 62: 181-189.
65. Galeotti M., Beraldo P., Patarnello P., Sarli G. & Volpatti D. (1999). Encefalopatia-retinopatia virale (VER-VNN) in giovanili di branzino (*D. labrax*) in assenza di lesioni tipiche di vacuolizzazione cellulare. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 27: 45-56.
66. Glazebrook J.S. & Campbell R.S.F. (1987). Diseases of barramundi (Lates calcarifer) in Australia: a review. In: Management of Wild and Cultured Sea Bass/ Barramundi Lates calcarifer. Ed by J.W. Copland & D.I. Grey, ACIAR, Canberra: 204-206.
67. Glazebrook J.S., Heasman M.P. & De Beer S.W. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). J. Fish Dis., 13: 245-249.
68. Gomez D.K., Lim D.J., Baeck G.W., Youn H.J., Shin N.S., Youn H.Y., Hwang C.Y., Park J.H. & Park S.C. (2006). Detection of betanodaviruses inapparently healthy aquarium fishes and invertebrates. J. Vet. Sci., 4: 369-37.
69. Groff. J. M, Zinkl. J. G, (1999). Heamatology and clinical chemistry of- 15cyprinid fish, Vet. Clin. North Am. –Exotic 2, 741 – 776.
70. Grotmol S., Totland G.K., Kvellestad A., Fjell K. & Olsen A.B. (1995). Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*., 15, 5: 176-180.
71. Grotmol S., Totland G.K., Thorud K. & Hjeltnes B.K. (1997). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Org*., 29: 85-97.

72. Grotmol S., Bergh Ø. & Totland G.K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Org*., 36: 95-106.
73. Grotmol S. & Totland G.K. (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org*., 39: 89-96.
74. Grove S., Johansen R., Dannevig B.H., Reitan L.J. & Ranheim T. (2003). Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Dis. Aquat. Org*., 53: 211-221.
75. Grove S., Johansen R., Reitan L.J., Press C.McL. & Dannevig B.H. (2006). Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.*, 21, 5: 525-539.
76. Guo. Y. X, Wei. T, Dallman. K, Kwang. J, (2003). Induction of caspase – dependent apoptosis by betanodaviruses GGNNV and demonstration of protein α as an apoptosis inducer, Virology, 308, 74 – 82.
77. Haghighi Karsidani ,S., Zorriehzahra, M. J, Pourkazemi, M., Shenavar Masouleh, A., Bazari Moghaddam, S., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M., Alizadeh, M.,Chakmedouz, F, Ghasemi, M.(2009) Molecular investigation of Viral Nervous Necrosis in *Acipenser persicus* from Caspian Sea, First International Congress on Health Management & Diseases of Aquatic, Tehran, Iran.
78. Hassan M. D., Azmi T.I., Nazari A., Zorriehzahra M.J. (2008). Histopathological Studies of Viral Nervous Necrosis (VNN) in the Wild Golden Grey Mullet of the Caspian Sea, 6th ASEAN Microscopy Conference. A Nanoscience Science Approach in Commercialization, Malaysia.
79. Hassan. M. D., Hair Bejo.M. Azmi, T. I., Siti, S. A., Zorriehzahra, M.J., Mauida F. H., and Nazari.A. (2010). Development of Rapid Diagnostic Tools beased on Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and specific Antibodies for Identification and Diagnosis of Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) of Marine food fish. Procceding of 22nd Veterinary Association Malaysia Congress & 4th Wildlife Society of Zoo and Wildlife Medicine International Meeting .Kuala Lumpur, Malaysia, p 293.
80. Hegde.A, Chen. C. L, Qin. Q. W, Lam.T.J, Sin. Y. M, (2002). Characterization, pathogenisity and neutralization studies of nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore, Aquaculture, vol.213, 55 – 72
81. Hegde A., Teh H.C., Lam T.J. & Sin Y.M. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, Poecilia reticulata - comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol*., 148: 575-586.
82. Hegde, A., Lam, T.J., Sin, Y.M., (2005). Immune response of fresh water fish guppy (*Poicelia reticulate*) and guramy (*Trichogaster trichoptreus*) to recombinant coat protein of Epinephelus tauvina nervous necrosis virus, Aquaculture, 249, 77 – 84
83. Hrubec.T.C, Smith.S.A, Robertson.J.L, (2001). Age – related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass, journal Veterinary clinical pathology, vol.30, no.1, pp:8
84. Husgarõ S., Grotmol S., Hjeltnes B.K., Rodseth O.M. & Biering E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippolgossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org*., 45: 33-44.
85. Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M. & Furusawa I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org*., 43: 81-89.
86. Iwamoto T., Mise K., Mori K., Arimoto M., Nakai T. & Okuno T. (2001a). Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J. Gen. Virol*., 82: 2653-2662.
87. Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. & Nakai T. (1999). High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org*., 39: 37-47.
88. Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. & Nakai T. (2001b). A combined cell-culture and RT-PCR method for rapid detection of piscine nodaviruses. *J. Fish Dis.*, 24: 231-236.
89. Johan. M. J, Mahajan. C. L, (1979). The physiological response of fishes to a deficiency of cyanocobalamin and folic acid, Journal of Fish Biology, 14, 127 – 133.
90. Johnson S.C., Sperker S.A., Leggiadro C.T., Groman D.B., Griffiths S.G., Ritchie R.J., Cook M.D. & Cusack R.R. (2002). Identification and characterization of a Piscine Neuropathy and Nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic Coast of North America. *J. Aquat. Anim. Health*, 14: 124-133.

91. Johansen R., Grove S., Svendsen A.K., Modahl I. & Dannevig B. (2004a). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, 27: 327-341.
92. Johansen R., Sommerset I., Tørud B., Korsnes K., Hjortaas M.J., Nilsen F., Nerland A.H. & Dannevig B.H. (2004b). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 27, 10: 591-601.
93. Jung S.J., Miyazaki T., Miyata M. & Oishi T. (1996). Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Bull. Faculty Bioresources, Mie University*, 6: 9-16.
94. Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. & Ollevier F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, Dicentrarchus labrax (L.). J. Fish Dis., 20: 145-151.
95. Lin.C.C, Lin.J.H.Y, Chen. M. S, Yang. H. L, (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larve of grouper, Aquaculture, 268, 265 – 273.
96. Lu.M.W, Lin.C.S, (2003). Involvementof the terminus of grouper betanodavirus capsid protein in virus – like particle assembly, Arch viriligy, 148, 345 – 355.
97. Maeno Y., de la Peňa L.D. & Cruz-Lacierda E. (2002). Nodavirus infection in hatchery-reared Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides*: first record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol*., 37, 2: 87-89.
98. Maltese C., Antonetti P., Quartesan R., Ormelli S., Borghesan F., Manfrin A., Selli L., Castiglione F., Ferrantelli V., Guercio A. & Bovo G. (2005). Isolation of viral encephalopathy and retinopathy virus (VERV) from wild marine fish species in the Meditteranean sea. *In: 12th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Copenhagen (Denmark), 11-16 September 2005*: Poster 8.19.
99. Mladineo I. (2003). The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *J. Appl. Ichthyol*., 19: 366-370.
100. Moopam, 1983 .Manual of Oceanographic Observation and Pollutant Analyses Methods .Regional Organization for Protection of the Marine Environment (ROPME),kuwait .p 346.
101. Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T. & Kanno T. (1991). A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, 26: 209-210.
102. Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. & Furusawa I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (Pseudocaranx dentex) with nervous necrosis. Virology, 187: 368-371.
103. Mori K., Mangyoku T., Iwamoto T., Arimoto M., Tanaka S. & Nakai T. (2003). Serological relationships among geneotypic variants of betanodavirus. Dis. Aquat. Org., 57: 19-26.
104. Munday B.L., Langdon J.S., Hyatt A. & Humphrey J.D. (1992). Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 103: 197-211.
105. Munday B.L. & Nakai T. (1997). Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. World J. Microb. Biotech., 13: 375-381.
106. Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J. Fish Dis., 25: 127-142.
107. Muroga K. (1995). Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. *Fish Pathol.*, 30: 71-85.
108. Muroga, K., (2001). Viral and bacterial diseases of marin fish and shell fish in Japanese hatcheries, Aquaculture, 202, 23 – 44
109. Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29: 177-182.
110. Nakai T., Nguyen H.D., Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M. & Ootsuki K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathol*., 29: 211-212.
111. Nazari, A., Hassan, M. D., Zorriehzahra, M. E. J., Azmi, T. I., Siti, S. A., Sharifpour, I., Sharif Rohani, M. , Ramezani ,B. , Seyfuri, P. , Najafi, J., Nuri, M., (2010). Confirmation of Viral Nervous Necrosis disease in wild Golden grey mullet (*Liza auratus*) cuptured in Iranian coastal water of Caspian Sea. Procceding of 22nd Veterinary Association Malaysia Congress & 4th Wildlife Society of Zoo and Wildlife Medicine International Meeting .Kuala Lumpur, Malaysia, p 194.

112. Nguyen H.D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T. & Muroga K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 60: 551-554.
113. Nguyen H.D., Nakai T. & Muroga K. (1996). Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org*., 24: 99-105.
114. Nguyen H.D., Mushiake K., Nakai T. & Muroga K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquat. Org*., 28: 87-91.
115. Nguyen, H.D., Nakai, I., Muroga, K., Arimato, M., Mushiakc, K., Furusawa, I., (1992). Properties of a new Virus belong to nodaviridae found in larval striped jack (Pseudocaranx dentex) with nervous necrosis, Virology 187, 378 – 381
116. Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Dis. Aquat. Org., 18: 103-107.
117. Nishizawa T., Muroga K. & Arimoto M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health,* 8: 332-334.
118. Office Internationales Epizooties. (2006). Viral Encephalopathy and Retinopathy. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal, Office International des Epizooties (OIE), Paris, France : 169-175.
119. Oh, M. J., Jung, S.J., Kim,S.R., Rajendran, K.V., kim, Y.J., Choi, T. J., Kim, H.R,. Kim, J.D, (2002). A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery – reared red drum (*Sciaenops ocellatus),* Aquaculture, 211, 1 – 7
120. Peducasse S., Castric J., Thiery R., Jeffroy J., Le Ven A. & Baudin Laurencin F. (1999). Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis. Aquat. Org*., 36: 11-20.
121. Saeedi A.A., Zorriehzahra M.j., Ghiyasi M., Binaii M., Hadiyan M., & Mahdavi A., (2008) Comparison of some of the most important hematological parameters in *Liza auratus*, Book abstract of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Florence, Italy p: 112.
122. Schneemann A., Ball L.A., Delsert C., Johnson J.E. & Nishizawa T. (2005). Family Nodaviridae. In: Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. C.M., Fauquet , M.A., Mayo, J. Maniloff., U. Desselberger and L.A. Ball. (eds.), Elsevier, Academic Press, New York: 865-872.
123. Skliris G.P. & Richards R.H. (1998). Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture*, 169: 133-141.
124. Skliris G.P. & Richards R.H. (1999).Nodavirus isolated from experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish Dis*., 22: 315-318.
125. Skliris G.P., Krondiris J.V., Sideris D.C., Shinn A.P., Starkey W.G. & Richards R.H. (2001). Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. Virus Res., 75: 59-67.
126. Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Shinn A.P., Richards R.H. & Ferguson H.W. (2000). Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis*., 23: 419-422.
127. Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Jenkins M.E., Roy W.J., Richards R.H. & Ferguson H.W. (2001). Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. Vet. Record, 149: 179-181.
128. Stoskopf. M. K, Phelps. T. H, Bauer. B. A, (1993). Fish Medicine, W. B. Sanders company, chapter 9, 113 – 131
129. Sweetman E., Sweetman J., Le Breton A. & Grisez L. (1996). Nodavirus: a review of the findings of the XIV/NODA/95 investigation. *In: "Seabass and seabream culture: problems and prospects" European Aquaculture Society (ed.). Verona, Italy, 16-18 October 1996*: 87-101.
130. Tanaka S., Aoki H. & Nakai T. (1998). Pathogenicity of the Nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol*., 33: 31-36.
131. Thiéry R., Peducasse S., Castric J., Le Ven A., Jeffroy J. & Baudin Laurencin F. (1997). Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*., 17, 3/4: 118-122.
132. Thiéry R., Arnauld C. & Delsert C. (1999). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis*., 22: 201-207.
133. Thiery, R., Raymond, J. Ch., Castric, J., (1999). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrachus labrax*: study by nested revers transcriptase-polymerase chain reaction, Virus Research, 63, 11 – 17

134. Thiery.R, Cozient. J, Cabon. C. Y, Lamour. F, Baud. M, Scheemann. A, Oct (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the Europian sea bass by using betanodavirus virus – like particles, Jounal of virology, 10201 – 10207
135. Totland G.K., Grotmol S., Morita Y., Nishioka T. & Nakai T. (1999). Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Dis. Aquat. Org*., 38: 169-175.
136. Waagbø. R, Sandnes. K, Espelid. S, Lie. O, (1988). Haematological and biochemical analyses of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.,suffering from cold water vibriosis (Hitra diseas), Journal of Fish Diseas,1,417-423.
137. Watanabe K.I., Nishizawa T. & Yoshumizu M. (2000). Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org*., 41: 219-223.
138. Ucko, M, Colorini, A, Diamant, A. 2004. Nodavirus infections in Israeli mariculture. Journal of Fish Diseases, 27:459-469.
139. Yoshikoshi K. & Inoue K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, Oplegnathus fasciatus (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis., 13: 69-77.
140. Yoshikoshi, K., Inoue, K., (1990). Viral nervous necrosis in hatchery – reared larvae and juveniles of japans parrotfish, Oplegnathus fasciatuss, J. Fish Dis. 13, 69 – 77
141. Yoshimizu M., Suzuki K., Nishizawa T., Winton J.R. & Ezura Y. (1997). Antibody screening for the identification of nervous necrosis carriers in flounder broodstock. *In : Proceeding NRIA International Workshop on New approaches to Viral Diseases of Aquatic Animals, Kyoto*: 124-130.
142. Zafran, Harada T., Koesharyani I., Yuasa K. & Hatai K. (1998). Indonesian hatchery reared seabass larvae (*Lates calcarifer*) associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fisheries Res. J.*, 4: 19-22.
143. Zafran, Koesharyani I., Johnny F., Yuasa K., Harada T. & Hatai K. (2000). Viral nervous necrosis in humpback grouper *Chromileptes altivelis* larvae and juveniles. *Fish Pathol*., 35: 95-96.
144. Zahedi Tabarestani A., Ghiasi M., Saeedi A.A., Pourgholam R., & Zorriehzahra M.J. (2008), Isolation and identification of Vibrio sp. from southern Caspian Sea's diseased mullets (*Liza salieance* & *Liza ouratus*). Book abstracts of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries" (MALIAF). Florence,Italy. p: 124
145. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Sharifpour I., Gomes D.K., Chi S.-C., Soltani M., Mohd D., Hj H., Sharif Roani M. & Saidi A.A. (2005). Mortality wild golden mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea, associated with viral nervous necrosis like agent. *Iran. J. Fish. Sci*., 45: 43-58.
146. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Gomez D.K., Sharifpour I., Chi.S.C., Soltani M., Hasssn M.D., Rohani M., Saidi A.A., (2005). Mortality of wild Golden grey mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of Caspian Sea, associated with Viral Nervous Necrosis. Borok-2, International Symposium, Russia.
147. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Gomez D.K., Sharifpour I., Chi.S.C., Soltani M., Hasssn M.D., Rohani M., Saidi A.A., (2005). Mortality of wild golden grey mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of Caspian Sea, associated with Viral Nervous Necrosis.(Colloquium on Viruses of Veterinary and Public Health Importance, Kuala Lumpur, Malaysia.
148. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Gomez D.K., Sharifpour I., Chi.S.C., Soltani M., Hasssn M.D., Rohani M., Saidi A.A., (2006). Investigation on Morbidity and mortality of some fish sepsis in Caspian Sea, associated with Viral Nervous Necrosis (VVN).18th Veterinary Association Malaysia Scientific Congress, Kuala Lumpur, Malaysia.
149. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Chi C.S., Sharifpour I., Soltani M., Rohani M., Saidi A.A. (2006) Investigation on morbidity and mortality of some suspected fish species in Caspian Sea, associated with Viral Nervous Necrosis (VVN), in Iranian waters of Caspiam Sea. First International Symposium VNN2006, Hiroshima, Japan.
150. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Sharifpour I., Chi C.S., Hassan M.D., Soltani M., Rohani M., Saidi A.A., Gomez D.K. (2006). Mortality of wild Golden grey mullet(Liza auratus) in Iranian waters of Caspian Sea, associated with Viral Nervous Necrosis. World Aquaculture Society Conference, AQUA 2006 Conference, Florence, Italy.
151. Zorriehzahra M.J., Nakai T., Sharifpour I., Chi C.S., Hassan M.D., Soltani M., Rohani M., Saidi A.A., (2008) Viral Nervous Necrosis (VNN) as a new invasion viral disease, World Aquaculture Society Conference (WAS 2008); Pusan, South Korea.

152. Zorriehzahra M.J., Ghasemi M., Ghiasi M., Soltani M., Haghighi Karsidani S., Sharifpour I., Bovo G., Nakai T., Saidi A.A., Nazari A., Rohani M., Mosavi S. (2009) Viral Nervous Necrosis (VNN) as Epizootic and New Invasion Disease in Caspian Sea, Fifth Iranian Virology Conference, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak-Karaj, Iran.
153. Zorriehzahra M.J., Ghasemi M., Soltani M., Ghiasi M., Haghighi karsiadani S., Nazari A., Sharifpour I., Bovo ., Nakai T., Nouri M., Saidi A.A., Rohani M., Mosavi S. (2010) Viral Nervous Necrosis (VNN) Epizootic and New Invasion Disease in Caspian Sea, 16th Iranian Veterinary Congress, Tehran, Iran.

پیوست

پیوست شماره ۱- راهنمای تشخیصی بیماری VNN توسط سازمان OIE

CHAPTER 2.1.7.

VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY

NB: This disease is no longer listed in chapter 1.2.3 of the *Aquatic Code*.
This chapter has not been updated since 2003

SUMMARY

Viral encephalopathy and retinopathy (*VER*), *or viral nervous necrosis* (*VNN*) *has been reported as a serious disease of larval and juvenile and sometimes older marine fish that occurs almost world-wide except for Africa* (*23*). *To date, the disease has been reported in at least 30 fish species, with the greatest impact being in sea bass* (Lates calcarifer [*10*] *and* Dicentrarchus labrax [*2*]), *groupers* (Epinephelus akaara [*22*], E. fuscogutatus [*3*], E. malabaricus [*6*], E. moara [*25*], E. septemfasciatus [*9*], E. tauvina [*4*], E. coioides [*19*] *and* Cromileptes altivelis [*34*]), *jack* (Pseudocaranx dentex [*21*]), *parrotfish* (Oplegnathus fasciatus [*33*]), *puffer* (Takifugu rubripes [*25*]), *and flatfish* (Verasper moseri [*32*], Hippoglossus hippoglossus [*11*], Paralichthys olivaceus [*26*], Scophthalmus maximus [*1*]).

Virus particles of about 25-30 nm in diameter have been visualised in affected fish, and the agents in striped jack, barramundi, and European sea bass have been characterised and placed in the genus Betanodavirus, family Nodaviridae (*5, 21*). *Immunological studies have shown relationships between striped jack nervous necrosis virus* (*SJNNV, the type species of the genus Betanodavirus*) *and the other betanodaviruses. Genomic classification of betanodaviruses has shown close relationships, with major groupings being SJNNV-type, tiger puffer nervous necrosis virus* (*TPNNV*)*-type, barfin flounder nervous necrosis virus* (*BFNNV*)*-type and red-spotted grouper nervous necrosis virus* (*RGNNV*)*-type* (*27*). *Complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 of SJNNV and GGNNV* (*a grouper betanodavirus*) *have been reported* (*15, 29*).

All diseases are characterised by a variety of neurological abnormalities, such as erratic swimming behaviour (*spiral, whirling or belly-up at rest*) *and vacuolation of the central nervous tissues. Usually there is also vacuolation of the nuclear layers of the retina. In general, younger fish have more severe lesions; older fish have less extensive lesions and these may show a predilection for the retina* (*23*). *Intracytoplasmic inclusions have been described in brain cells of European sea bass, barramundi, Japanese parrotfish, and brownspotted grouper. Neuronal necrosis has been described in most species.*

Interesting differences with regard to the occurrence and severity of the diseases are shown in Table 1. There are considerable variations in the age at which disease is first noted and the period over which mortality occurs. In general, the earlier the signs of disease occur, the greater is the rate of mortality. Although disease occurrence at the juvenile stages in some species is very rare, mass mortalities often occur at juvenile to young stages in the other fish species, but usually do not reach 100%, indicating the age-dependence of susceptibility (*23*). *Mortalities have been reported in production-size European sea bass* (*18*) *and grouper* (*9*), *but even in these cases mortalities were greatest in younger fish.*

It has been demonstrated that vertical transmission of the causative agent occurs in Pseudocaranx dentex *and this fact is reflected by the early occurrence of clinical disease. This finding led to the successful control of VNN of larval striped jack, where elimination of virus-carrying broodstock by reverse-transcription polymerase chain reaction and disinfection of fertilised eggs by ozone were applied* (*20, 24*). *Paradoxically, ovarian infection has also been reported in* Dicentrarchus labrax *in which disease is usually not seen until about 30 days post-hatch. The mode of transmission/introduction of the viruses, other than in gametes and by cohabitation, has not been demonstrated, but the possibilities include influent water, juvenile fish held on the same site, and carriage on utensils, vehicles, etc. It is possible that these small viruses are quite resistant to environmental conditions* (*8*) *and therefore readily translocated by commercial activities. Vaccination using a recombinant capsid protein is*

at the experimental stage (*14, 30*).

Table 1. *Important features of VER/VNN of larval and juvenile fish*

	Earliest occurrence of disease	**Usual onset of disease**	**Latest occurrence of new outbreaks**	**Usual mortality rate**	**Highest mortality rate**
Lates calcarifer	9 days post-hatch	15-18 days post-hatch	>24 days post-hatch	50-100%/ month	100% in <1 month
Dicentrarchus labrax	10 days post-hatch	25-40 days post-hatch	Body weight 400-580 g	10%/month	-
Oplegnathus fasciatus	6(25 mm total length	-	<40 mm total length	-	Up to 100%
Epinephelus akaara	14 days post-hatch (7-8 mm total length)	9-10 mm total length	<40 mm total length	80%	Up to 100%
Epinephelus malabaricus	-	20-50 mm total length	-	50-80%	-
Pseudocaranx dentex	1 day post-hatch	1-4 days post-hatch	<20 days post-hatch (8 mm total length)	100%	-
Scophthalmus maximus	<21 days post-hatch	-	Body weight 50-100 mg	-	Up to 100%

DIAGNOSTIC PROCEDURES

Presumptive diagnosis of viral encephalopathy and retinopathy (VER) or viral nervous necrosis (VNN) can be made on the basis of the appearance of vacuoles in the brain, spinal cord and/or retina as seen by light microscopy. However, individual fish with the presence of only a few vacuoles in the nervous tissues pose a difficult diagnostic problem.

Virus particles can be visualised in affected brain and retina by both positive and negative staining. In positively stained material, the virus is mainly associated with vacuolated cells and, especially, any inclusions. The reported particles vary in size from 22 to 34 nm arranged intracytoplasmically in crystalline arrays, or as aggregates and single virions both intra- and extracellularly. The virus is nonenveloped and icosahedral in shape.

All betanodaviruses can be detected by the indirect fluorescent antibody test (IFAT) or immunohistochemistry with a rabbit anti-SJNNV serum (12, 16). Most can be detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with a single primer set designed to amplify the T4 region (427 bases) of SJNNV coat protein gene (27, 28) (this primer set can be used for detection of all the genotypic variants of betanodaviruses with only one exception [31]). Although other immunological methods, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or neutralisation test, are available for virus identification, they can only be used for some of betanodaviruses because of limited serological information.

The betanodaviruses can be cultured in a fish cell line, SSN-1, which is derived from striped snakehead (7, 16). A clonal cell line, E-11, derived from the SSN-1 cell line is useful for qualitative and quantitative analyses of all the betanodaviruses (17). It is notable that both SSN-1 and E-11 cells are infected by a spontaneously productive C-type retrovirus designated SnRV (13, 17).

Due to insufficient knowledge of the serological responses of fish to virus infections, the detection of fish antibodies to viruses has not thus far been accepted as a routine screening method for assessing the viral status of fish populations.

Fish material suitable for virological examination is:

- **Asymptomatic fish** (apparently healthy fish): whole larvae or small juveniles; brain, spinal cord, and eyes for larger size fish and/or ovarian fluid from broodfish at spawning time.

- **Clinically affected fish**: whole larvae or small juveniles; brain, spinal cord, and eyes for larger size fish.

Sampling procedures: see Chapter I.1. Section B.

1. Standard Screening Method for VER/VNN

1.1. Isolation of betanodaviruses in cell culture

Cell line to be used: SSN-1 or E-11 (a cell clone of SSN-1)

a) Inoculation of cell monolayers

i) Fish samples are homogenised with nine volumes of Hanks' balanced salt solution (HBSS), centrifuged and filtered (0.2 µm membrane filter).

ii) Tenfold dilutions of the virus filtrate are inoculated in monolayers of cells cultured using Leibovitz L-15 medium or other medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Inoculate at least 2 cm^2 of drained cell monolayer with 100 µl of each dilution.

iii) Allow to adsorb for 1 hour at room temperature, add the medium supplemented with 5% FBS and incubated at 20-25°C.

Note: Optimal growth temperatures are different among the four genotypic variants: 25-30°C for RGNNV-type, 20-25°C for SJNNV-type,
20°C for TPNNV-type, and 15-20°C for BFNNV-type (16, 17).

b) Monitoring incubation

i) Follow the course of infection in positive controls and other inoculated cell cultures by daily microscopic examination for 10 days.

ii) If cytopathic effect (CPE) appears in those cell cultures inoculated with the dilutions of the tested homogenate supernatants, betanodavirus identification procedures must be

undertaken (see Section 1.2. below).

Note: CPE in SSN-1 or E-11 cells is characterised by thin or rounded, refractile, granular cells with vacuoles, the monolayer then partially or completely disintegrates (7, 16).

iii) If no CPE occurs after 10 days of incubation, subcultivation of the inoculated cell cultures must be performed.

c) Subcultivation procedures

i) Collect aliquots of cell culture medium from all monolayers inoculated with organ homogenates.

ii) Inoculate cell monolayers as described in Section1.1.a.

iii) Incubate and monitor as described in Section 1.1.b.

1.2. Identification of betanodavirus isolated in cell culture

a) Indirect fluorescent antibody test

i) Prepare monolayers of cells in 2 cm^2 wells of cell culture plastic plates or on cover-slips (or chamber slides) in order to reach around 70% confluency, which is usually achieved within 24 hours of incubation at 25°C.

ii) Inoculate the virus suspensions to be identified by making tenfold dilution steps directly in the cell culture wells or flasks.

iii) Incubate at 20°C or 25°C for 48-72 hours (See Section 1.1.a. Note).

iv) Remove the culture medium, rinse once with PBS, then fix with methanol for 10 minutes.

v) Allow the cell monolayers to air-dry.

vi) Treat the cell monolayers with a rabbit anti-betanodavirus serum for 30 minutes at 37°C in a humid chamber, and rinse four times with PBS-Tween 80 (PBST).

vii) Treat the cell monolayers for 30 minutes at 37°C with commercially available fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit Ig antibody, and rinse with PBST.

viii) Examine the treated cell monolayers on plates immediately, or mount the cover-slips using glycerol saline, pH 8.5, prior to microscopic observation.

b) Reverse-transcription polymerase chain reaction

i) Total RNA is extracted from virus-inoculated cells by a commercially available RNA extraction kit according to the manufacturer's instructions.

ii) There are several published primers for RT-PCR amplification of betanodaviruses. Primers, R3 (5'-CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA-3') and F2 (5'-CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT-3'), designed to amplify the T4 region (427 bases) of SJNNV coat protein gene, are available for all genotypic variants (27).

2. Diagnostic Methods for Clinically Diseased Fish

2.1. Direct detection in fish tissues

a) Indirect fluorescent antibody test

i) Fish samples fixed in 10% buffered formalin are dehydrated and embedded in paraffin wax. Deparaffinise sections and rehydrate to PBS.

ii) The sections are treated with 0.1% trypsin in PBS at 37°C for 30 minutes.

iii) After washing with cold PBS, proceed as described in Section 1.2.a. steps vi to viii.

iv) Specific fluorescence is observed in the cytoplasm of the affected cells in brain, spinal cord, or retina.

b) Immunohistochemistry (*avidin-biotin-alkaline phosphatase technique*) (*12*)

i) Prepare paraffin sections as described above in Section 2.1.a.

ii) Add a blocking solution, for example 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS) for 20 minutes.

iii) Incubate with the anti-betanodavirus rabbit serum for 30 minutes, and wash in TBS.

iv) Add biotinylated goat anti-rabbit Ig for 30 minutes, and wash in TBS.

v) Add streptavidin alkaline phasphatase complex, incubate for 30 minnutes, and wash in TBS.

vi) Add fuchsin chromogen reagent for 5 minutes, and wash in tap water

vii) Counterstain with haematoxylin.

viii) A positive result is indicated by red colour.

c) *Reverse-transcription polymerase chain reaction*

i) The fish sample is homogenised with distilled water treated with 0.1% diethyl pyrocarbonate.

ii) Centrifuge at 10,000 ***g*** for 10 minutes.

iii) Using the supernatant, continue as described in Section 1.2.b.

2.2. Virus isolation in cell culture

See Section 1.1.

REFERENCES

1. Bloch B., Gravningen K. & Larsen J.L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 65-70.

2. Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F. & Pichot Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**, 109-116.

3. Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. & Chen S.N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *E. akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis*., **20**, 185-193.

4. Chua F.H.C., Loo J.J. & Wee J.Y. (1995). Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. *In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Schariff M., Arthur J.R. & Subasinghe R.P., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 235-241.

5. Comps M., Pepin J.F. & Bonami J.R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123**, 1-10.

6. Danayadol Y., Direkbusarakom S. & Supamattaya K. (1995). Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. *In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Schariff M., Arthur J.R. & Subasinghe R.P., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 227-233.

7. Frerichs G.N., Rodger H.D. & Peric Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax. J. Gen. Virol*., **77**, 2067-2071.

8. Frerichs G.N., Tweedie A., Starkey W.G. & Richards R.H. (2000). Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, **185**, 13-24.

9. Fukuda Y., Nguyen H.D., Furuhashi M. & Nakai T. (1996). Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, **31**, 165-170.

10. Glazebrook J.S., Heasman M.P. & De Beer S.W. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis*., **13**, 245-249.

11. Grotmol S., Totland G.K., Thorud K. & Hjeltnes B.K. (1997). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus. Dis. Aquat. Org*., **29**, 85-97.

12. Grotmol S., Bergh O & Totland G.K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Org*., **36**, 95-106.

13. Hart D., Frerichs G.N., Rambaut A. & Onions D.E. (1996). Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the snakehead fish retrovirus. *J. Virol*., **70**, 3606-3616.

14. Husgard S., Grotmol S., Hjeltnes B., Rodseth O.M. & Biering E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org*., **45**, 33-44.

15. Iwamoto T., Mise K., Mori K., Arimoto M., Nakai T. & Okuno T. (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for s*triped jack nervous necrosis virus*, the type species of the *Betanodavirus. J. Gen. Virol*., **82**, 2653-2662.

16. Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. & Nakai T. (1999). High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org*., **39**, 37-47.

17. Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M. & FURUSAWA I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org*., **43**, 81-89.

18. Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. & Olievier F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis*., **20**, 145-151.

19. Lin L., He J., Mori K., Nishioka T., WU J.L., Wengs S., Mushiake K., Arimoto M. & Nakai T. (2001). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China. *Fish Pathol*., **36**, 186-188.

20. Mori K., Mushiake K. & Arimoto M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol*., **33**, 443-444.

21. Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. & Furusawa I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology,* **187**, 368-371.

22. Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T. & Kanno T. (1991). A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol*., **26**, 209-210.

23. Munday B.L., Kwang J. & Moody N.(2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis*., **25**, 127-142.

24. Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol*., **29**, 177-182.

25. Nakai T., Nguyen H.D., Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M. & Ootsuki K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathol*., **29**, 211-212.

26. Nguyen H.D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T. & Muroga K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.*, **60**, 551-554.

27. Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T. & Muroga K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol*., **63**, 1633-1636.

28. Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org*., **18**, 103-107.

29. Tan C., Huang B., Chang S.F., Ngoh G.H., Munday B.L., Chen S.C. & Kwang J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol*., **82**, 647-653.

30. Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T. & Nakai T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis*.,

24, 15-22.

31. Thiery R., Arnauld C. & Delsert C. (1999). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis*., **22**, 201-207.

32. Watanabe K., Yoshimizu M., Ishima M., Kawamata K. & Ezura Y. (1999). Occurrence of viral nervous necrosis in hatchery-reared barfin flounder. *Bull. Fac. Fish. Hokaido Univ*., **50**, 101-113.

33. Yoshikoshi K. & Inoue K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis*., **13**, 69-77.

34. Zafran, Koesharyani I., Johnny F., Yuasa K., Harada T. & Hatai K. (2000). Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathol.,* **35**, 95-96.

* * *

NB: There are OIE Reference Laboratories for Viral encephalopathy and retinopathy (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE Web site for the most up-to-date list: www.oie.int).

پیوست شماره ۲- دستورالعمل اجرائی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی (VNN)

کلیه مراکز تابعه

با سلام ، احتراما به منظور ایجاد وحدت رویه و هماهنگی لازم در اجرای طرح ملی نکروز عصبی ویروسی (VNN) به پیوست دستورالعمل اجرائی آن که توسط مجری مسؤل محترم طرح ملی تدوین و نگارش یافته است به حضور ارسال می گردد. شایسته است ترتیبی اتخاذ فرمائید تا به نحو مقتضی در اختیار مجریان استانی و همکاران مرتبط با این طرح ملی قرار گرفته و مبنای عملیات اجرائی این طرح ملی قرارگیرد.

در ضمن با توجه به اعتبارات ارسالی مناسب به آن پژوهشکده انتظار می رود با توجه به محدودیت ها و تنگناهای زمانی فصل صید ، عملیات اجرائی و نمونه برداری های مورد نظر در اسرع وقت آغاز گردد.

همکاران محترم این بخش و مجری مسئول محترم طرح ملی آماده پاسخگوئی به سوالات همکاران عزیز خواهند بود.

رئیس بخش بهداشت و بیماری های آبزیان

دکتر عیسی شریف پور

رونوشت:

۱- ریاست محترم موسسه جهت استحضار (به انضمام یک نسخه از دستورالعمل اجرائی)

۲- معاونت محترم تحقیقاتی موسسه جهت استحضار (به انضمام یک نسخه از دستورالعمل اجرائی)

۳- گروه ماهیان دریائی جهت اطلاع و پیگیری های لازم

بسمه تعالی

دستورالعمل اجرائی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی (VNN)

به منظور هماهنگی لازم در اجرای عملیات آزمایشگاهی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی(VNN)، دستورالعمل ذیل به مراکز تحقیقاتی ذیربط منعکس می گردد. مسئولیت حسن اجرای این دستورالعمل بر عهده مجریان استانی طرح ملی خواهد بود:

۱) شایسته است اکیپ های نمونه برداری در مراکز تحقیقاتی گیلان و مازندران بصورت مستمر و برنامه ریزی شده به تعاونی های صید پره در طول فصل صید مراجعه نموده و ضمن بررسی دقیق ماهیان صید شده در گونه های مختلف موارد ابتلای احتمالی و اطلاعات اولیه ضروری را در فرم های ویژه ثبت نمایند. تلاش اکیپ های نمونه برداری برآن باشد که در وهله اول ماهیان مبتلا دارای علائم بالینی (اتساع و تورم نامتعارف محوطه شکمی، تغییر رنگ احتمالی، آثار بیحالی و شنای غیر عادی – وجود ضایعات هموراژیک و سپتی سمیک احتمالی در چشم و اندامهای خارجی) مورد انتخاب قرار گیرند، در غیر اینصورت ماهیان بظاهر سالم مورد نمونه برداری قرار گیرند.

۲) حتی المقدور نمونه های اخذ شده بصورت زنده به آزمایشگاه ارسال و مورد فرآوری قرار گیرند.بخاطر داشته باشید که ماهیان مرده و تلف شده که مدت زمان زیادی از مرگ آنان گذشته باشد از نظر تشخیصی فاقد ارزش می باشند.

۳) در آزمایشگاه نمونه های زنده پس از ثبت مشخصات بالینی در فرم های مخصوص، با رعایت شرایط مورد نظر از ساقه دمی ماهیان خونگیری لازم بعمل آید. در صورت دشواری در یافتن ورید ساقه دمی می توان مستقیما از قلب ماهی خونگیری نمود.

۴) نمونه های خون اخذ شده به همراه ماده ضد انعقاد(ترجیحا هپارین) در کنار یخ نگهداری و جهت انجام بررسی های هماتولوژی سریعاً به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (مازندران – ساری) ارسال گردد.

۵) قسمتی از خون نیز بدون ماده ضد انعقاد در لوله های مخصوص به آرامی ریخته شده و پس از انجام سانتریفوژ کوتاه و جدا سازی سرم و انتقال آن به لوله های ویژه، به منظور مطالعات سرولوژیک در فریزر ^{oc} ۲۰- نگهداری شود. با توجه به لیزه شدن سریع گلبول های قرمز در ماهیان و آزاد شدن هموگلوبین آن که به سرعت انجام می پذیرد، کار جداسازی سرم در آزمایشگاه بایستی سریعاً صورت پذیرد(در صورت توقف طولانی آزاد شدن هموگلوبین موجب تغییر رنگ سرم شده و مراحل بعدی با دشواری روبرو خواهد بود.

۶) پس از انجام خونگیری، ماهیان مورد بیومتری قرار گرفته و مشخصات ظاهری ماهیان همچون طول، وزن، جنسیت و گونه ماهیان در فرم های ویژه ثبت می گردد. طراحی و تهیه فرم های مزبور براساس موارد مشابه توسط مجریان استانی می تواند صورت پذیرد.

۷) پس از ثبت علائم بالینی و نشانه های ماکروسکوپی و در صورت لزوم بررسی ماهیان از نظر انگل های خارجی، به هر نمونه کد معینی که مشخص کننده زمان و مکان نمونه برداری، فرد نمونه گیر، گونه و نام علمی ماهی و سایر اطلاعات مورد نیاز می باشد داده خواهد شد. در هنگام نکروپسی نیز بایستی برای هر بافت یا اندام نیز کد مشخصی در نظر گرفت که بطور مثال می توان از حروف اختصاری هر بافت به شرح ذیل بهره گرفت:

SPECIMEN CODES

TYPE CODE	DESCRIPTION
BR	BRAIN
KD	KIDNEY
HE	HEART
LI	LIVER
SP	SPLEEN
SB	SWIM BLADDER
GI	GILL
SK	SKIN
WB	WHOLE BLOOD
PL	PLASMA
SE	SERUM
ST	STOMACH
IN	INTESTINE
EY	EYE
GO	GONAD
SP	SPERM
OF	OVARIAN FLUID
EG	EGG
FR	FRY
PA	PANCREAS
MU	MUSCLE
BO	BONE
SC	SPINAL CORD

۸) ماهیان در شرایط کاملاً آسپتیک و در مجاورت یخ کالبد گشائی شده و اندام های هدف همچون مغز و چشم در اولویت اول و سپس کبد، کلیه، طحال و قلب در مرحله دوم و در نهایت معده، روده، گونادها ، کیسه شنا و آبشش واز ماهیان مولد در صورت لزوم اسپرم ومایعات تخمدانی بصورت استریل خارج شده و جهت سه هدف اساسی ذیل مورد استفاده قرار می گیرند:

۱-۸) قسمتی از آنها جهت تهیه **Supernatant** به شرح ذیل مورد فرآوری قرار خواهند گرفت:

اندامهای مورد نظر بصورت کاملاً آسپتیک از بدن ماهیان خارج شده و در محلول بافر Phosphate buffered saline یا (PBS) قرار گرفته و توسط همزن برقی بصورت هموژن درآمده و سپس به مدت ده دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه (2000 rpm) قرار می گیرد، سپس جهت استریل کردن نهایی و جدا کردن باکتری های احتمالی، محلول رویی حاصل از سانتریفوژ از فیلتر ۰/۴۵ نانومتر عبور داده شده و مایع حاصل در ظروف Ependorf دو سی سی ریخته شده و پس از برچسب زدن در فریزر ^{oc} ۲۰- نگهداری می شوند.

مراحل آخر کار بایستی در زیر هود و در مجاورت شعله صورت پذیرفته و ارسال نمونه های منجمد جهت مراحل بعدی آزمایش در صورت دسترسی به یخ خشک بایستی در مجاورت یخ خشک صورت پذیرد. در غیر اینصورت در مجاورت یخ بایستی سریعاً ارسال شده و مورد مطالعات مورد نظر قرار گیرد.

۲-۸) بخش دیگری از نمونه های اخذ شده جهت مطالعات ویروس شناسی و کشت سلول در محیط VTM یا (Viral Transport Media) قرار گرفته و در مجاورت یخ به پژوهشکده آبزی پروری گیلان ارسال خواهد شد درصورتی که امکان انجام کشت ویروس بر روی تیره های سلولی در گیلان فراهم بود، بلافاصله توسط همکاران مرکز و براساس پروتکل موجود در سند مصوب طرح ملی، اقدام به انجام آزمایش های مورد نظر شده و در غیر اینصورت نمونه های دریافتی تا فراهم شدن شرایط لازم در فریزر ^{oc} ۸۰- نگهداری خواهند شد.

۳-۸) قسمتی از نمونه های اخذ شده جهت انجام مطالعات مولکولی بکار گرفته خواهد شد. چنانچه انجام آزمایشات مولکولی RT-PCR و مونیتورینگ نمونه ها مد نظر بود، بایستی کلیه مراحل استخراج RNA ویروسی و چیدمان نمودن (Set up) آزمایش بر مبنای پروتکل اجرائی مربوط به آزمایش VNN از شرکت سازنده کیت صورت پذیرد (بطور مثال کیت تشخیص VNN از شرکت IQ-2000 که پیوست می باشد)،

چنانچه هدف صرفاً استخراج RNA ویروسی از نمونه های مشکوک باشد می‌توان نمونه های مشکوک را پس از هموژن نمودن در ازت مایع منجمد نمود و یا در فریزر ^{oc} ۸۰- نگهداری نمود. پس از دیفراست نمودن نمونه ها، به ۱۰۰ میلی گرم نمونه هموژن شده بافتی، ۲/۴ میلی لیتر از بافر هضمی می توان افزود. فرمول بافر مزبور شامل اجزای ذیل می باشد:

100 mm Nacl
10 m Tris- Hcl (pH=8)
25 mm EDTA (pH=8)
%0.5 Sodium do decyl Sulphat
0/1 mg ml $^{-1}$ proteinase k

پس از افزودن این بافر به نمونه آنرا به مدت سه ساعت در انکوباتور ^{oc} ۶۵ می توان قرار داد و سپس در این مجموعه هضمی به روش Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol می توان RNA ویروسی را جهت مطالعات مولکولی و آزمایش RT-PCR استخراج نمود.

۹) نحوه تقسیم نمونه ها و برچسب گذاری آنها باید بگونه ای باشد که در صورت مشاهده موارد مثبت در RT-PCR، منبع اصلی نمونه های مثبت نیز جهت انجام آزمایشات تکمیلی همچون ویروس شناسی در دسترس باشد تا بتوان عامل بیماری را شناسائی و تائید نمود.

۱۰) در صورتی که تعداد نمونه ها بیش از حد بود می توان هر پنج ماهی را بصورت یک Pool درآورده و آنرا به عنوان یک نمونه واحد در نظر گرفت.

۱۱) با توجه به مباحث مطروحه در کارگاه آموزشی مورخ ۸۵/۱۰/۱۲ در گیلان، قسمتی از نمونه های اخذ شده براساس پروتکل های یاد شده و نیز مطالب موجود در دستورالعمل ارسالی «روشهای آزمایشگاهی بیماریهای ماهی» جهت مطالعات آسیب شناسی و میکروسکوپ الکترونی مورد فرآوری قرار گیرند. بدیهی است مقدمات انجام این مطالعات در هر سه مرکز قابل اجرا بوده و نحوه تقسیم وظایف آن در سند پروژه مصوب جدید پیش بینی شده است.

۱۲) جهت مطالعات آسیب شناسی، نمونه های مورد نظر در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و پس از فرآوری مقاطع بافتی به ضخامت 5mm تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار خواهند گرفت. در مواردی که نمونه ها صرفاً جهت بررسی های آسیب شناسی انتخاب می گردند، شایسته است قبل از خروج نمونه‌ها از بدن ماهی، نسبت به تزریق فرمالین ۱۰٪ به داخل بافت های مغز و چشم اقدام لازم صورت پذیرد.

۱۳) جهت مطالعات میکروسکوپ الکترونی نیز بایستی حتماً از بافت ماهیان تازه استفاده کرد (نمونه های منجمد و کهنه فاقد ارزش و اعتبار علمی است) در این مورد نیز چنانچه نمونه ها صرفاً جهت بررسی های میکروسکوپ الکترونی انتخاب می گردند، شایسته است قبل از خروج نمونه ها از بدن ماهی نسبت به تزریق گلوتار آلدئید ۴٪ به داخل بافتهای مغز و چشم اقدام لازم صورت پذیرد. مراحل فیکس نمودن نمونه ها تا مرحله آبگیری در کارگاه آموزشی گیلان بصورت عملی به اجرا درآمد و جزئیات آن و نحوه آماده سازی بافرها نیز در دستورالعمل ارسال یاد شده بطور مبسوط قابل بهره برداری است. پس از فیکس نمودن نمونه ها که می توان آنرا به مدت طولانی در یخچال نگهداری نمود. جهت انجام مراحل بعدی (آبگیری- آغشتگی با رزین- قالب گیری ، پلیمویزه کردن و برش گیری) بایستی هماهنگی های لازم با مراکز داخل و خارج کشور که واجد امکانات فوق الذکر می باشند از طریق مجریان استانی صورت پذیرد.

۱۴) جهت انجام آزمایش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم بافتی (**IFAT**) به سه شیوه ذیل می توان عمل کرد:

۱-۱۴) در روش گسترش بافتی می توان از نمونه بافتی مورد نظر (ترجیحاً مغز و چشم) گسترش لازم را تهیه نمود. ترجیحاً بعد از کالبد گشایی ماهی در زیر هود تکه ای از بافت مورد نظر را با پنس برداشته و در نقاط

مختلف لام به حالت Imprinting (انگشت نگاری) تماس داده و پس از خشک شدن در هوا با استن سرد می توان آنرا فیکس نمود و پس از کد گزاری آنرا با فویل آلومینیم پوشانیده و تا زمان انجام آزمایش آنها را در فریزر ۲۰- تا ۷۰- درجه می توان نگهداری نمود. بایستی دقت نمود که لامها به هیچ عنوان در طول نگهداری خیس نگردند.

۲-۱۴) به منظور بررسی آلودگی احتمالی ماهیان بالغ و مولیدن در مراکز تکثیر ماهیان دریائی، پس از صید و انتقال آنها به ظروف خاص، در آزمایشگاه می توان مقداری از مایعات تناسلی (مایعات تخمدانی یا اسپرم) را بر روی لام ریخته و با لبه لام دیگر گسترش لازم را تهیه نمود و بعد از خشک شدن در هوا آنها را با استون سرد فیکس نموده و همچون روش بالا با فویل پوشانیده و در فریزر ^{oc} ۲۰- تا ^{oc} ۷۰- نگهداری نمود.

۳-۱۴) در روش دیگر، نمونه های اخذ شده در فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس شده و پس از پروسس نمونه ها و تهیه مقاطع بافتی با ضخامت mm ۵ آنها را دپارافینه نموده و در PBS دهیدراته می گردند. سپس مقاطع با تریپسین ۰/۱ در صد در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه فرآوری شده و سپس با PBS سرد شستشو می شوند. در مرحله بعدی بر روی اسلایدها از آنتی بادی Rabbit anti- betanodavirus serum ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{oc} ۳۷ در شرایط مرطوب قرار می دهیم و سپس آنرا با PBST یا (PBS- tween 80) شستشو می دهیم. در مرحله بعدی آنتی آنتی بادی فلوروسینه یا Fluorescien isothiocyanate conjugaed anti Rabbit Ig antibody را در دمای ^{oc} ۳۷ به مقاطع اضافه نموده و سپس با PBST شستشو می گردند. در پایان با گلیسرول سالین با pH= 8.5 مونته گردیده و با میکروسکوپ فلورسنت رویت می گردند.

۱۵) جهت انجام آزمایش ایمونو هیستو شیمی **(Immunohistochemistry)** به شرح ذیل می توان اقدام نمود:

مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرون از بلوک های پاراقینه تهیه کرده و پس از دپارافینه نمودن توسط PBS هیدراته می گردند. در مرحله بعدی مقاطع را در تریپسین ۰/۱ ٪ در PBS در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و در پی آن با یک محلول Blocking بطور مثال (Bovin Serum Albumin) یا BSA ۵٪ در TBS برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می گردند. در مرحله بعدی اسلاید ها با سرم خرگوشی ضد betanodavirus یا (Anti-betanodavirus rabbit serum) انکوبه می گردند و در پی آن توسط TBS شستشو می شوند. سپس به اسلاید ها Biotinylated goat anti-Rabbit Ig را برای مدت ۳۰ دقیقه اضافه نموده و در پایان با TBS شستشو انجام می شود. در مرحله بعدی کمپلکس Strep avidin alkalin phosphatease را اضافه نموده و پس از مدت ۳۰ دقیقه در TBS شستشو انجام می شود. سپس کروموژن فوشین را برای مدت ۵ دقیقه اضافه نموده و با آب جاری شستشو می دهیم و در پایان با هماتوکسیلن رنگ آمیزی تفریقی انجام داده و اسلاید ها را مونته می کنیم که در مشاهده میکروسکوپی موارد مثبت با رنگ قرمز مشخص می گردند. شایان ذکر است که این قسمت با هماهنگی همکاران مرکز تشخیص رفرانس سازمان دامپزشکی در پیکان شهر تهران انجام خواهد شد.

۱۶) جهت انجام مطالعات بیماریزایی **(Pathogenicity)** به شرح ذیل می توان اقدام نمود:

به منظور تائید تشخیص بیماری ، ویروسهای جدا شده بر اساس پروتکل اجرائی که متعاقبا ارسال خواهد شد به طریق چشمی(Intravitreous injection) به ماهیان سالم حساس تزریق شده و بصورت مستمر بیماریزایی آن بر روی ماهیان مورد بررسی قرار می گیرد. همچنین به منظور بررسی راه های انتقال بیماری ، روش حمام دادن یا غوطه وری نیز در این بررسی بایستی مورد استفاده قرار گرفته و نتایج آن با هم مورد مقایسه و بررسی قرار گیرند.

۱۷) به منظور بررسی حساسیت سایر گونه های آبزیان به ویروس احتمالی جدا شده به شرح ذیل می توان اقدام نمود:

در این راستا پس از خالص سازی ویروس جدا شده بـه روش (Mori *et al* , 1992) و تیتراسـیون ویـروس و تعیـین TCID (به روش Chi. *et al* , 1997) که پروتکل های آن متعاقبا ارسال خواهد شد، در شرایط آزمایشـی و ایزولـه ، ماهیان مزبور بر اساس پروتکل ارسالی جدید مورد challenge قرار گرفته و بچه ماهیان و ماهیان جوان گونه هـای مزبور نیز از نظر حساسیت به این ویروس و احتمال انتقال بیماری و ضایعات احتمالی مورد بررسی و مطالعه همـه جانبه قرار خواهند گرفت . (جهت انجام آزمایش مواجهه با ویروس (Expose) گونه های قره برون ، فیل ماهی ، سوف ، کپور دریائی و ماهی سفید انتخاب شده اند. مواجهه ماهیان استخوانی باهماهنگی و مسئولیت پژوهشکده گیلان در انستیتو انجام می شود. Treat آب خروجی و استفاده از آکواریوم یا ونیرو نیز متناسب با اندازه ماهیهـا انجام خواهد شد.) شایان ذکر است این بررسی بر روی ماهیان مزبور در شرایط کاملاً قرنطینـه و ایزولـه صـورت خواهد گرفت،

پیوست شماره ۳

موسسه تحقیقات شیلات ایران

بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان

گزارش تخصصی

" وقوع اولین مورد بیماری نکروز عصبی ویروسی

(VER / VNN)

Viral encephalopathy and retinopathy (VER)

or

Viral nervous necrosis (VNN)

در ماهیان کفال طلایی (Golden grey mullet)

دریای مازندران "

مقدمه :

کفال ماهیان از ماهیان دریایی هستند که در آبهای مناطق معتدل و گرمسیر انتشار دارند و فقط سه جنس از آنها در آبهای شیرین زندگی می کنند.غذای این ماهیان در سنین مختلف و مراحل رشد بدین صورت است که بچه ماهیان کفال از پلانکتونها ،بچه ماهیان یکساله از پلانکتونها و جانوران کفزی و در بقیه مراحل زندگی از بقایای گیاهان و جانوران[1] تغذیه کرده و اصطلاحاً دتریت خوار می باشند که در این مرحله با دیگر ماهیان استخوانی در

رقابت نیستند . در دریای خرز دو گونه کفال *Liza-saliens* و *Liza-auratus* زندگی می کنند که بیشترین جمعیت کفال ماهیان را گونه دوم *Liza-auratus* تشکیل می دهند.

این ماهیان تقریباً نیمی از ذخائر ماهیان استخوانی را در دریای خزر به خود اختصاص می دهند و مراحل مختلف تولید مثل و تکثیر آنها در شرایط دریا انجام می شود و مهمتر این که با تغذیه از بقایای جانوری و گیاهی (دتریت ها)[1] در پالایش بستر از تجمع مواد آلی حاصل از تجزیه آنها وحفظ تعادل اکوسیستم آبی ، نقش مهمی را ایفا می نمایند با توجه به نوع غذای مصرفی و اینکه همراه این دسته از مواد غذایی ،بقایای آلاینده ها (سموم نباتی ،هیدروکربورهای نفتی ،فلزات سنگین) و پروتئین های سمی ممکن است مورد استفاده قرار گیرند لذا بیشتر در معرض این نوع آلودگی ها و تضعیف سیستم ایمنی قرار دارند. ضمن آنکه عوامل بیماریزای زنده (میکروارگانیسم ها و انگل ها) نیز ممکن است بصورت اختصاصی کفال ماهیان را به عنوان میزبان انتخاب نمایند. معمولاً بیماری های ماهیان وحشی به دلیل شرایط زندگی آنها ، عدم دسترسی و در نهایت عدم امکان کنترل و درمان، کمتر مورد توجه قرار می گیرد. متأسفانه در طول سالهای اخیر علائم غیر متعارف در کفال ماهیان حوزۀ جنوبی دریای خزر در دو مقطع زمانی متفاوت (سال ۸۲ و ۸۰) مشاهده گردیده است که قطعاً در صورت استمرار ،ضمن وارد نمودن خسارات اقتصادی به ذخایر ماهیان دریای خزر و مشکلات زیست محیطی ، ممکن است مشکلاتی را از منظر بهداشت عمومی و مصرف انسانی به دنبال داشته باشد:

۱) در سال ۱۳۸۰ حفاظت منابع استان مازندران و معاونت صید و صیادی گزارش نمودند که در سواحل مازندران (بابلسر) کفال ماهیان تلف شده و یا در حال تلف شدن مشاهده می گردند که متعاقب آن همکاران پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به منطقه عزیمت نموده و تعداد ۱۵۰ قطعه کفال اوراتوس در حال مرگ از سواحل بندر فریدونکنار که در مجاورت بابلسر قرار دارد جمع آوری گردید. ماهیان مزبور علایمی مانند : خونریزی های جلدی بصورت رگه های خونریزی ، خونریزی های ریز داخل عضلانی (پتشی و اکیموز) و

[1] - Detritus

اتساع شکم (آسیت) را به همراه داشتند. این حالت در بررسی بعمل آمده در هیچ یک از جایگاه های صید ماهیان استخوانی مشاهده نگردید.

۲) در تاریخ ۸۲/۱۱/۶ متعاقب گزارش مکتوب مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر (گیلان) مبنی بر مشاهده مواردی از تورم شکی در میان ماهیان صید شده شرکت های تعاونی پره منطقه جفرود تا زیباکنار استان گیلان هماهنگی های لازم از سوی بخش بهداشت و بیماری های آبزیان موسسه در خصوص اعزام همکاران به منطقه و بازدید از تعاونی های مربوطه و انجام نمونه برداری های لازم از ماهیان مبتلا ، آب دریا و بستر بر اساس دستورالعمل های مربوطه صورت گرفت . در بازدید از منطقه مشاهده گردید که ماهیان مبتلا که اغلب در دامنهٔ وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم بوده ، در اثر اتساع کیسهٔ شنا و تجمع گاز بسیار در آن دچار تورم محوطه بطنی ،بیحالی و تحرک کم شده و به پهلو و یا بصورت طاقباز (سطح شکمی ماهی رو به بالا) در آب شنا نموده و به آسانی با دست و یا توسط پرندگان صید می شدند. سطح ظاهری بدن و چشمها فاقد هر گونه ضایعات مرضی و اروزیون ها ی خاص بوده و در کالبد گشایی علاوه بر اتساع غیر عادی کیسهٔ شنا و تجمع گاز در آن ، دژنرسانس کبد و تجمع صفرای شفاف و بیرنگ در کیسهٔ صفرا ،تجمع مقادیر غیر عادی ماسهٔ ریز دریا در سکوم ،روده ها و پیش معده ،آتروفی کلیه ها و در مواردی نیز پرخونی و آثار خونریزی در روده ها مشاهده گردید (تصاویرذیل).

نمونه های مبتلا به آزمایشگاه مرکز منتقل و پس از خونگیری جهت آزمایشات هماتولوژی و سنجش آنزیم های سرمی SGPT, LDH و ALP و SGOT مورد کالبد گشایی قرار گرفته و از اندامهای داخلی : کبد ، کلیه ، آنزیم های کبدی ،طحال ، کیسهٔ شنا ،روده و پیش معده ،مغز ، آبشش ، پوست و عضله ،کیسهٔ صفرا و گونادها نمونه های مورد نظر جهت مطالعات آسیب شناسی تهیه و در فرمالین ۱۰٪ فیکس و به آزمایشگاه تهران منتقل گردید. همچنین در تاریخ ۸۲/۱۱/۱۱ مواردی از ماهیان مبتلا از دریا صید و بصورت زنده با کپسول اکسیژن و بصورت منجمد (در داخل فویل آلومینیومی) مجاور یخ به تهران منتقل و جهت انجام آزمایشات تکمیلی باکتریولوژی به آزمایشگاه منتقل گردید.

با عنایت به اهمیت ذخایر کفال ماهیان در دریای خزر و میزان صید آن که در سال های اخیر روند صعودی داشته است (تابلوی شماره ۱)و تجریه تلخ شانه دار مزاحم و کاهش شدید ذخایر ماهیان کیلکا و مسایل حاشیه ای اجتماعی همچون شایعه ارتباط این عارضه با وقوع احتمالی زلزله در منطقه و نگرانی های مردم و مسئولین منطقه و صحبت های شفاهی صیادان مبنی بر کاهش مزه و کیفیت طعم ماهی کفال در ذائقه مردم و نیز کاهش قیمت آن در بازار همگی ایجاب می نمود که موضوع با حساسیت ویژه از نزدیک مورد پیگیری لازم قرار گیرد تا بتوان قبل از وقوع یک بحران جدید دیگر در دریای خزر، از تبعات احتمالی آن جلوگیری نمود.

در راستای پیگیری های بعمل آمده و اخذ نتایج آزمایشات بعمل آمده مشخص گردید که نتایج آزمایشات آب شناسی و رسوبات بستر طبیعی بوده و مورد خاصی در پارامترهای فیزیکو شیمیایی آب دریا و رسوبات بستر مشاهده نگردید (جداول آزمایشات فیزیکو شیمیایی به پیوست ضمیمه می باشد) ، همچنین نتایج آزمایشات باکتریولوژی و انگل شناسی و تک یاخته شناسی نیز منفی اعلام گردید.

تابلوی شماره ۱: آمار صید سالیانه کفال ماهیان دریای خزر

سال	۱۳۷۰	۱۳۷۱	۱۳۷۲	۱۳۷۳	۱۳۷۴	۱۳۷۵	۱۳۷۶	۱۳۷۷	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲
میزان صید (تن)	۳۹۷۰	۴۲۴۴	۴۱۴۵	۲۴۲۴	۳۵۴۶	۲۹۰۶	۲۸۵۴	۳۷۸۸	۳۶۸۴	۴۵۴۸	۵۲۶۳	۶۴۴۶	* ۴۰۰۰

* میزان پیش بینی شده تا پایان سال ۸۲

(مآخذ : مدیریت ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران)

با توجه به جمعیت ماهیان در معرض خطر , منطقه جغرافیایی , میزان وقوع بالای آن , نتایج بررسی های بعمل آمده , وقوع عارضه مزبور برای اولین بار در منطقه و کشور و نبود گزارش و منابع علمی داخلی در این خصوص جهت روشن شدن علت اصلی بروز این عارضه در کفال ماهیان در راستای ارتباطات علمی بین المللی با مراکز

تحقیقاتی معتبر با آقای Dr. Igor shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (VNIIPRH) وارد مشاوره شده و علائم بالینی ماهیان مبتلا , نتایج اقدامات انجام شده به همراه تصاویری از سیمای کلینیکی بیماری , و نحوه وقوع بیماری در منطقه به آگاهی ایشان رسید (در تاریخ ۱۱ بهمن ماه ۸۲) .

با توجه به بررسی های بعمل آمده برروی منابع و اطلاعات موجود , بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) به عنوان مظنون اولیه مورد توجه قرار گرفته و بر این اساس نمو نه های مورد نظر بویژه از نقطه نظر آسیب شناسی وجستجوی ضایعات و اکوئوله در بافت مغز تهیه و مورد بررسی های تخصصی قرار گرفت .

در این ارتباط مقاطع آسیب شناسی از بافتهای : کبد , کلیه , مغز , طحال , آبشش , کیسه شنا , پوست و عضلات , روده و پیش معده تهیه و مورد بررسی قرار گرفته و در بافت مغزمواردی از آثار و اکوئوله شدن مشاهده گردید . در این راستا با توجه به عدم دسترسی به تیره سلولی SSN-1 جهت کشت سلولی و نیز پرایمرهای اختصاصی جهت انجام آزمایش PCR ,آزمایشگاههای رفرانس سازمان جهانی بیماری های واگیر دام (OIE) مورد شناسایی واقع گردید (فهرست آن ضمیمه می باشد).

علاوه بر آن با یکی از محققین برجسته تایوانی Prof. Chi Shau chi مذاکره گردید نامبرده قبلاً این بیماری را در کشور تایوان برای اولین بار شناسایی نموده بود.همچنین علاوه برایشان , با سه مرکز رفرانس این بیماری در کشورهای ایتالیا , ژاپن و کره جنوبی مکاتبه گردید و با ارائه تاریخچه بیماری , علائم بالینی و تشخیص اولیه از آنان در خواست گردید تا ضمن موافقت با ارسال نمونه های مرضی ,آزمایشات تکمیلی از قبیل : کشت سلولی جهت جداسازی ویروس ,آزمایشات سرمی همچون FAT, مطالعات هیستو پاتولوژی ومولکولی PCR جهت تشخیص نهایی صورت پذیرد . (تصویر مکاتبات ضمیمه می باشد) .

در مورد کشور روسیه , از همان ابتدا آقای Dr. Igor اعلام نموده بودند که به علت عدم دسترسی به کفال ماهیان و نبود بیماری VNN در آن کشور هیچگونه امکانات تشخیصی چون تیره های سلولی و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص این بیماری در اختیار ندارند .

خـوشبختـانه از چهار آزمـایشگاه مـورد مکاتبه Prof. Shau chi از تـایوان و Prof.Toshihiro Nakai از کشـــور ژاپـن به این در خواست پاسخ مثبت دادند . (پاسخ ها ضمیمه می باشد)

لازم به ذکر است بعدها مشخص گردید که علت عدم پاسخ دو آزمایشگاه دیگر در ایتالیا و کره جنوبی تغییر آدرس آنان و عدم دریافت فاکس ارسالی بوده است . متعاقباً پیگیری های بعمل آمده موفق به ایجاد ارتباط رایانه ای با آقای Dr. BOVO در ایتالیا شده و خوشبختانه اطلاعات و تصاویر ارزشمندی از طریق ایشان دریافت گردیدکه مقالات واصله در پیگیری های بعدی بسیار موثر بوده است. .

در تاریخ سوم اسفند ماه براساس دستورالعمل های دریافتی از نامبردگان که اغلب بر طبق مقررات و پروتکل های سازمان OIE تدوین شده بود ، عملیات آماده سازی نمونه هاجهت ارسال به آزمایشگاههای رفرانس با همکاری آزمایشگاه گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی تهران به شرح ذیل انجام گردید :

۱. ماهیان صید شده که قبلاً دارای علائم بالینی مورد نظر بوده و بصورت زنده سریعاً منجمد شده بودند جهت تهیه نمونه در نظر گرفته شدند.

۲. ماهیان مزبوردر شرایط آسپتیک کالبد گشایی شده و از اندامهای داخلی چون : کبد , کلیه , طحال , چشم و مغز نمونه برداری شده و این نمونه هابصورت استریل خارج شده و کبد و طحال با هم و نـمونه های مغز بـصورت جـداگـانـه از پنج مـاهی مبتـلا استخراج و در محلول بافر (PBS)[1] قرار گرفته و توسط همزن برقی بصورت هموژن در آمده و سپس به مدت ده دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفته , سپس جهت استریل کردن نهایی و جدا کردن باکتری های احتمالی نمونه های مغز از فیلتر ۰/ ۴۵nm استفاده گردید و محلول رویی حاصل از سانتریفوژ (Supernatant) از این فیلتر عبور داده و مایع حاصل را در ظروف استریل مخصوص بنام Ependorf 2^{cc} ریخته و پس از برچسب زدن[2] در فریزر -۲۰^{c} قرار داده شد .

[1] - Phosphate buffered saline

ز ۳.

مونه های مغز , چشم و انـــدامهای داخلی (کبد , کلیه , طحال) که قبلاًدر فرمالین ۱۰٪ فیکس شده بود , پس از خروج از فرمالین در داخل کاغذ صافی آغشته به الکل ۷۰ ٪ قرار گرفته و آن جهت جلوگیری از تبخیر الکل در میان فویل آلومینیوم بسته بندی شده و برچسب گذاری[۱] گردید . این نمونه ها جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی و FAT تهیه گردید .

ه ۴.

مچنین تعدادی مقطع آسیب شناسی شامل کبد ، کلیه ، طحال ، کیسه صفرا ، کیسه شنا ، روده ، مغز و چشم که آثار ضایعات خا صی از قبیل واکوئولاسیون در مغز را دارا بودند در فویل آلومینوم بسته بندی و سپس برچسب گذاری شد .

شایان ذکر است ، بر اساس دستورالعمل ارسالی از سوی آزمایشگاههای رفرانس یاد شده ، در ابتدا مقرر بود نمونه های منجمد در مجاورت یخ خشک[۲] بسته بندی و ارسال گردد تا شرایط مناسب تری جهت حفظ و بقای پاتوژن های احتمالی فراهم گردد ولی متاسفانه علیرغم یافتن منابع تهیه یخ خشک و هماهنگی های مربوطه ، شرکت پست پیشتازمربوطه (DHL) به دلیل مقررات داخلی خود ، موافق با پذیرش و ارسال نمونه های منجمد همراه با یخ خشک نبود .

علی ایحال نظر به اهمیت موضوع و پیگیری های همکاران مرکز تحقیقات گیلان به دلیل شرایط خاص استان ، علیرغم میل باطنی مبنی بر وجود شرایط غیر استاندارد در حمل نمونه ها ، نسبت به ارسال نمونه های یاد شده به کشور ژاپن و تایوان در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۶ اقدام لازم صورت گرفته و مراتب طی نامه ای به اطلاع آنان رسید (تصاویر مکاتبات پیوست می باشد)

لازم به ذکر است با توجه به حساسیت گمرک کشور تایوان نسبت به محموله های حاوی اجرام پاتوژن و بنا به در خواست پروفسور Shau - Chi کلیه نمونه های ارسالی با برچسب مونو کلونال آنتی بادی (mAb) علامت

---

۱ - Labeling
۲ - Dried - Ice

گذاری و کد بندی شد و جزئیات مربوط به نمونه های ارسالی بصورت واضح و مشخص از طریق E.mail به آگاهی ایشان رسید . متعاقب پیگیری های بعمل آمده مشخص گردید که نمونه های ارسالی به کشور تایوان و ژاپن به ترتیب در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۹ و ۸۲/۱۲/۲۰ به آزمایشگاههای مزبور واصل گردیده است .

خوشبختانه نمونه های مزبور جهت انجام آزمایشات مولکولی مناسب تشخیص داده شد و متعاقباً در تاریخ ۸۲/۱۲/۲۷ اولین پاسخ از کشور تایوان دریافت گردید ، بر اساس پاسخ ارسالی از سوی Prof..Shau Chi در دومین دور از آزمایش PCR بر روی یکی از نمونه های مغز ارسالی از کفال ماهیان ، RNA ویروس VNN یافت شده است ولی به دلیل شرایط نامناسب حمل نمونه ها ، نوار حاصله بر روی ژل آگاروز بسیار ضعیف بوده و امکان تهیه عکس از آن میسر نبوده است .

همچنین ایشان اسلایدهای پاتولوژی را نیز بررسی نموده ولی به دلیل کیفیت نامناسب مقاطع آسیب شناسی ، نامبرده اطمینان کامل از علت بروز آثار واکوئولاسیون در مقاطع نداشت .

در جمع بندی ایشان اعلام نظر نمودند که بر اساس آزمایشات انجام شده ، ماهیان کفال به ویروس VNN آلوده شده اند ولی با اطمینان قادر به بیان این موضوع نبودند که این ویروس عامل اصلی این ابتلای سراسری باشد و در پایان خواستار ارسال نمونه های جدید در شرایط انجماد و در مجاورت یخ خشک شدند تا مجدداً مورد آزمایشات PCR قرار گیرد .

در تاریخ ۸۲/۱۲/۲۹ از سوی Prof.Nakai از آزمایشگاه رفرانس کشور ژاپن اولین گزارش مقدماتی دریافت گردید . ایشان در این گزارش خود اعلام نمودند که در کمال تعجب تمام نمونه های مغز ارسالی در آزمایش RT- PCR نسبت به Piscine nodavirus عامل ایجاد بیماری VNN مثبت بوده اند . مقرر شد ایشان در آینده ای نزدیک گزارشی کامل از نتایج آزمایشات انجام شده را ارائه نمایند .

در فاصله مزبور و در ایام تعطیلات نوروزی و به دلیل اهمیت موضوع از طریق E.mail با ایشان درتماس بوده و از طریق نامبرده و Prof.Shau Chi اطلاعات جامع و ارزشمندی در خصوص راههای کنترل و پیشگیری ، درمان احتمالی ، احتمال انتقال این بیماری به سایر گونه های آبزی در دریای خزر همچون ماهی سفید و ماهیان

خاویاری ،.خطر انتقال بیماری از طریق مصرف ماهیان مبتلا به انسان و احتمال بیماری مشترک بودن آن ، احتمال سرایت بیماری به ماهیان پرورشی آبهای شیرین و ماهیان پرورش در قفس[۱] دریای خزر ، سرنوشت نهایی ماهیان مبتلا و درمان احتمالی آنها ، علت ایجاد بیماری و راه اصلی ورود ویروس به دریای خزر دریافت و مورد مباحثه قرار گرفت که جهت آگاهی بیشتر تصویر کلیه مکاتبات ضمیمه می باشد .

مجموع اطلاعات حاصله حاکی از آن است که بحران جدیدی در انتظار دریای خزر و صنعت آبزی پروری کشور می باشد و با توجه به طبیعت ویروس و خطر انتشار سریع آن در دریای خزر و ذخائر ارزشمند آبزیان که می تواند بر اقتصاد منطقه آثار نگران کننده ای داشته باشد ، .این موضوع و پیگیری های بعدی آن می تواند از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد .

لازم به ذکر است که Prof..Nakai در آخرین E.mail ارسالی ضمن درخواست نمونه جدید بیشتر جهت انجام آزمایشات تکمیلی با ارسال پروتکل ویژه ای خواستار انجام آزمایشات بیماریزایی[۲] و انتقال تجربی بیماری بر روی ماهیان به ظاهر سالم شده که با توجه به هماهنگی های بعمل آمده با همکاران پژوهشکده اکولوژی دریای خزرپس ازتهیه ماهیان کفال سالم ، مراحل مختلف این آزمایش نیز در آینده نزدیک انجام و پیگیری خواهد شد..

لازم به ذکر است که این بیماری (VNN) تاکنون بر روی ۳۰ گونه از ماهیان مختلف در کلیه نقاط جهان به جز قاره افریقا مشاهده شده است و با توجه به دامنه وسیع میزبانان که در سراسر جهان بسیاری از گونه های ماهیان دریایی را مبتلا کرده و در بسیاری از موارد منجر به مرگ و میر بچه ماهیان و ماهیان جوان شده که بالطبع منجر به کاهش وسیع ذخایر موجود خواهد شد ، پیش بینی بر آن است که در سال جاری و فصل آینده صید با کاهش قابل توجهی از کفال ماهیان در دریای خزر روبرو بوده و مشکلات بیشتری عاید صیادان منطقه شود .

درضمن طبق اظهارنظر مدیر کل شیلات استان گیلان میزان صید ماهیان استخوانی در استان گیلان در فصل صید اخیر در مقایسه با مدت مشابه در سال گذشته به میزان ۲۴٪ کاهش داشته است .

---

۱ -Cage culture

۲- Pathogenicity

لذا در نهایت ، توصیه بر آن است که در اولین گام، با طراحی و تصویب یک پروژه تحقیقاتی ویژه و تامین اعتبارات مورد نیاز در اسرع وقت مطالعات تکمیلی آغاز گردد تا بتوان با تشخیص سریع و تعیین میزبانان حساس در دریای خزر اقدامات بعدی در خصوص تدوین راههای کنترل و پیشگیری از انتشار بیماری صورت پذیرد .

در خاتمه اطلاعات تکمیلی در مورد این بیماری به پیوست ایفاد می گردد .

دکترسید جلیل ذریه زهرا

مدیر گروه بیماریهای ماهیان آب شیرین

بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان

موسسه تحقیقات شیلات ایران

پیوست شماره ٤ – گزارش تخصصی بیماری نکروز عصبی ویروسی(VNN)

بسمه تعالی

بیماری نکروز عصبی ویروسی Viral Nervous Necrosis (VNN) این بیماری به عنوان یک بیماری ویروسی خطرناک بسیاری از بچه ماهیان ، ماهیان جوان و در پاره ای از موارد ماهیان دریایی بالغ را مبتلا نموده و تقریباً در سراسر جهان به استثنای افریقا رخ می دهد.

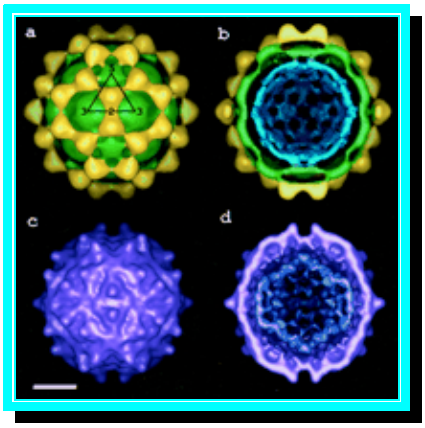
در حال حاضر این بیماری از سی گونه ماهیان مختلف آبهای جهان گزارش شده که بیشترین تاکید بر روی گونه های ماهیان ذیل بوده است :

1-sea bass 2-Groupers 3-Jack 4-Puffer 5-Flatfish

نمایی از تلفات بیماری(VNN) در بچه ماهیان Sea bass

اتیولوژی و سبب شناسی بیماری :

ویروس عامل بیماری نکروز عصبی متعلق به جنس بتانوداویروس (Betanodavirus) و از خانواده نوداویریده (Nodaviridae) به عنوان یک عضو جدید این خانواده محسوب می شود. قطر این ویروس ۲۵–۲۰ نانومتر بوده فاقد پاکت بوده ودارای تقارن کروی تا چند وجهی می باشد (تصویرذیل)



۲ پروتئین ساختاری موجود در Capsid ویروس از نوع گلیکوپروتئین می باشد و دارای وزن های مولکولی ۴۱ و ۴۳ کیلودالتون می باشند. ژنوم بتانودا ویروس همانند جنس آلفانوداویروس (Alphanodavirus) (از جمله نوداویروس های مربوط به حشرات) دارای دو مولکول RNA تک رشته ای است که وزن این دو مولکول RNA ؛ $۰/۵\times۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۳}\times$ ۱/۰۲ کیلو دالتون می باشد. نوداویروس های ماهی در چهار ژنوتیپ ذیل طبقه بندی می شوند:

1- TPNNV: Tigre Puffer nervous nerosis virus
2- SJNNV: Striped Jack nervous necrosis Virus
3- BFNNV: Barfin flounder nervous necrosis Virus
4- RGNNV: Red – Spotted grouper nervous necrosis Virus

بافت عصبی به عنوان بافت هدف در این بیماری تلقی می شود و انتشار ویروس در بافت های دیگر بسته به گونه و سن ماهی متفاوت است .

نمایی از پرخونی بافت مغزماهی در بیماری(VNN) **در بچه ماهیان** *Sea bass*

این ویروس به pH = ۳ (بسیار اسیدی) و pH = ۱۰-۱۲ (بسیار قلیائی) بسیار حساس بوده و تیتر ویروس در این حالت به میزان 10^{4} کاهش می یابد. در یک تیمار یک ساعته و در دمای 60^{oC} قابلیت بیماریزایی ویروس را می توان متوقف کرد . ویروس عامل نکروز عصبی در دمای ^{oC} ۲۴-۳۲ منجر به ظهور ضایعات CPE بر روی تیره سلولی SSN-1 می شود.

علائم بالینی و یافته های کالبد گشایی:

علائم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی مشخص می گردد. مواردی همچون رفتارهای شنای تامتعارف (مارپیچی ، چرخشی یا خوابیده بر آب با شکمی متورم) و بروز حالات

واکوئولاسیون (حفره حفره) در بافت عصبی مرکزی از موارد شاخص این بیماری است . معمولاً حالات و اکوئوله شدن در لایه های هسته دار بافت شبکیه چشم نیز وجود دارد. بطور معمول در ماهیان جوان ضایعات با شدت بیشتری به چشم می خورد . در ماهیان مسن تر ضایعات گسترده نبوده و در این سنین ضایعات نسبت به شبکیه تمایل بیشتری دارند. حضور گنجیدگی های داخل سیتوپلاسمی از سلولهای بافت مغز در برخی گونه ها ، گزارش شده است ولی در اغلب گونه ها نکروز بافت عصبی عارضه ای معمول بوده و بکرات مشاهده شده است

.

حالات واکوئوله شدن در بافت عصبی مغز و شبکیه چشم ماهی مبتلا به بیماری (VNN)

نمایی ازآثار کالبد گشایی ماهی مبتلا و تورم کیسه شنا در بیماری(VNN) **در ماهیان جوان***Sea bass*

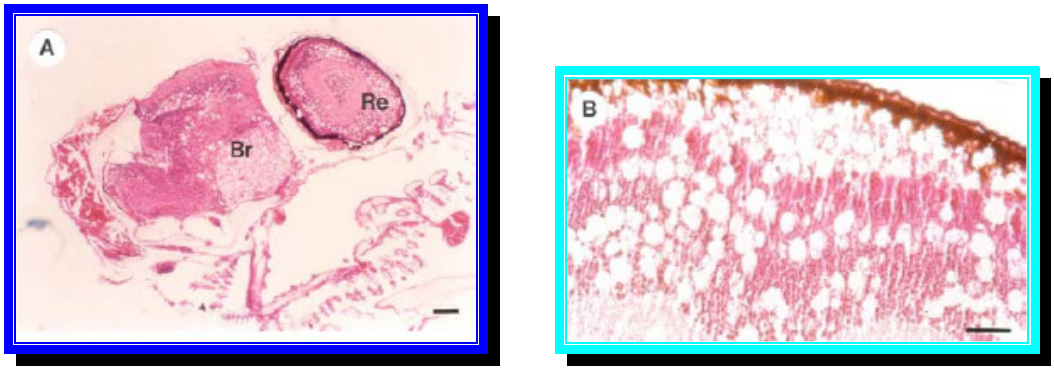
در روند معمول بیماری ، با شروع اولین علائم بالینی ، مرگ و میر قابل توجهی در ماهیان رخ می دهد . با وجود آنکه بیماری در ماهیان جوان در برخی گونه ها بندرت اتفاق می افتد ولی مرگ و میر در سایر گونه ها اغلب در سنین پایین و ماهیان جوان رخ می دهد که معمولاً به حد ۱۰۰ ٪ نمی رسد . این موضوع بیانگر وابسته به سن بودن و حساسیت ماهیان جوان به بیماری است . مرگ و میر قابل توجهی از ماهیان گونه *Sea bass* اروپایی و هامور (*grouper*) در سنین بازاری گزارش شده است ولی در این گونه ها نیز مرگ و میر بیشتر در ماهیان جوان مشاهده شده است . انتقال عمودی عامل مسببه بیماری در گونه *P.dentex* به اثبات رسیده است و این حقیقت با رخداد زودرس چهره بالینی بیماری در ماهیان جوان مشخص شده است .این نتایج منجر به کنترل بیماری در بچه ماهیان جنس *Striped Jack* به نحو موفقیت آمیزی شده است که این عمل به کمک آزمون تشخیصیRT – PCR و به منظور تشخیص مولدین حامل ویروس ونیز ضد عفونی تخمهای بارور به وسیله گاز ازن صورت گرفته است .

همچنین بر خلاف انتظار ، آلودگی مایعات تخمدانی نیز در گونه *D. Labrax* مشاهده است ، این در حالی است که بطور معمول بیماری دراین گونه معمولاً سی روز پس از بارور نمودن تخمها مشاهده می شود .

در خصوص راه انتقال و معرفی ویروس به محیط به غیر از انتقال از طریق سلول های جنسی و همزیستی ماهیان با هم تاکنون راه دیگری به اثبات نرسیده است ولی احتمالاتی همچون آبهای جاری ، ماهیان جوانی که در یک مکان نگهداری می شوند ، ظروف حمل ماهیان و کشتی ها نیزدر انتقال بیماری مطرح می باشند . این موضوع به اثبات رسیده است که اینگونه ویروس های کوچک نسبت به شرایط محیطی کاملاً مقاوم بوده لذا می توانند به سهولت توسط فعالیت های تجاری در جهان منتشر گردند..

روند تشخیص بیماری :

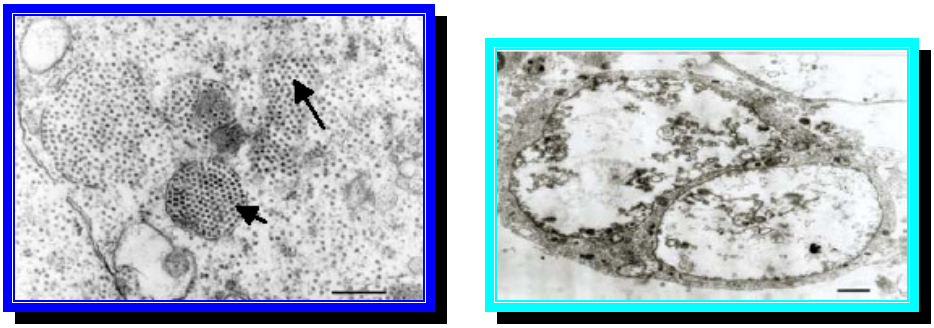
تشخیص اولیه بیماری VNN بر اساس ظهور ضایعات و اکوئولی در بافت مغز، نخاع و شبکیه چشم ماهیان مبتلاست که توسط میکروسکوپ نوری قابل تشخیص است . اگر چه در ماهیان منفردی که ضایعات و اکوئوله کمی را در بافت های عصبی خود نشان می دهند ، تشخیص امر دشواری است .



حالات واکوئوله شدن در بافت عصبی مغز(Br) **و بافت شبکیه چشم** (Re) **ماهی مبتلا به بیماری** (VNN)

ذرات ویروسی در بافت های مغز و شبکیه ماهیان مبتلا هم در رنگ آمیزی مثبت و هم منفی قابل مشاهده است . در رنگ آمیزی مثبت ، ویروس با سلول های واکوئوله شده مرتبط بوده و با گنجیدگی هایی همراه است .ذرات

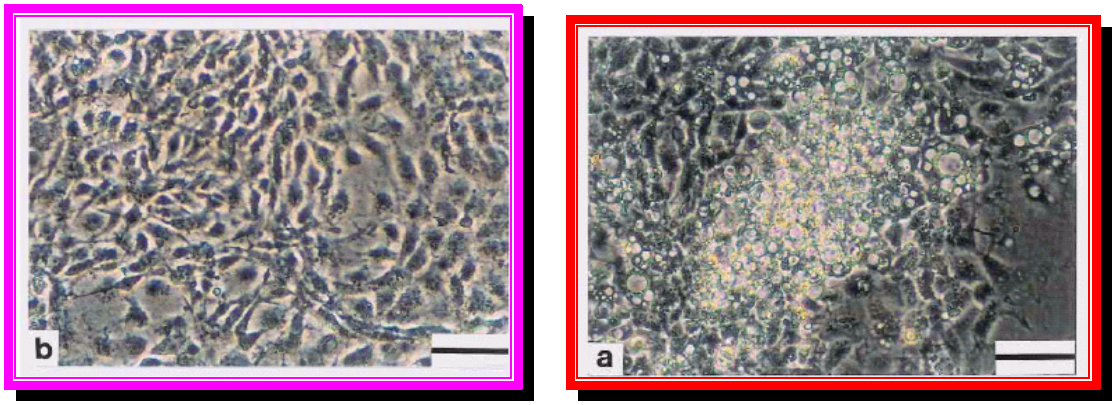
ویروسی متنوعی از حد ۲۲ تا ۳۴ نانومتر در داخل سیتوپلاسم سلولهای مبتلا در این بیماری گزارش شده است . گاهی نیز این ذرات بصورت یک ویریون منفرد درهم متراکم شده و داخل و یا خارج سلول مشاهده می شود .



نمایی ازآثار ذرات ویروسی در بافت های مبتلا در بیماری(VNN)

تمامی بتانودا ویروس ها در بیماری VNN توسط آزمایشات پادتن های درخشان غیر مستقیم Indirect fluorescent antibody test یا (IFAT) و آزمایش Immunohistochemistry قابل شناسایی می باشند که این آزمایش توسط آنتی بادی Rabbit anti- SJNNV Serum که در خرگوش تهیه شده صورت می پذیرد . همچنین اغلب موارد توسط آزمایش RT – PCR قابل تشخیص می باشند که این کار بر اساس پرایمر (Primer) منفردی که بر اساس ناحیه T_4ژن پروتئین پوشش ویروس SJNNV با ۴۲۷ باز طراحی شده صورت می پذیرد .(این پرایمر جهت شناسایی انواع ژنوتیپ های متنوع نودا ویروس های عامل VNN ، بجز یک مورد استثناء ، کارآیی دارد) با وجود آنکه سایر روش های سرولوژیک همچون (ELISA) و(NT) نیز برای شناسایی ویروس ها مطرح بوده و در دسترس می باشند، در مورد بتانودا ویروس ها به دلیل آنکه اطلاعات سرولوژیک محدودی وجود دارد ، تنها برای برخی موارد در VNN مورد استفاده قرار می گیرد .

همچنین می توان بتانودا ویروس ها را در تیره سلولی SSN- 1 کشت داد که این تیره سلولی از ماهی بنام Striped snake head مشتق شده است . نوعی تیره سلولی مشتق شده از SSN-1 که آن را E -11 می نامند برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی همه بتانودا ویروس کاربرد فراوان دارد .



نمایی ازآثار CPE در تیره سلولی SSN- 1 (سمت راست) و مقا یسه آن با نمونه طبیعی (سمت چپ) در بیماری VNN

به دلیل فقدان اطلاعات کافی در پاسخ های ایمنی وسرولوژیک ماهیان به عفونت های ویروسی ، تعیین میزان تیتر آنتی بادی های ضد ویروس VNN در ماهیان مبتلا ، تاکنون به عنوان یک روش معمول و متعارف جهت ارزیابی آلودگی ویروسی در جمعیت ماهیان مورد پذیرش قرار نگرفته است .

مواد مناسب جهت نمونه برداری برای آزمایشات ویروس شناسی :

- ماهیان فاقد علائم بالینی (ماهیان بظاهر سالم) :

کل بدن بچه ماهیان و ماهیان جوان و برای ماهیان بزرگتراستفاده از بافت مغز ، نخاع و چشمها ضروری است . همچنین مایعات تخمدانی از مولدین ماده در فصل تخمریزی نیز توصیه می شود .

- ماهیان مبتلا و دارای علائم بالینی :

کل بدن بچه ماهیان و ماهیان جوان و برای ماهیان بزرگتر برداشت مغز ، نخاع و چشم ها الزامی است .

نمونه های فوق الذکر بر اساس شرایط استاندارد نمونه برداری (Sampling) انتخاب و بر اساس نوع آزمون در محیط های خاص نگهدارنده قرار گرفته و در شرایط حمل استاندارد جهت انجام آزمایشات مربوطه به آزمایشگاه تخصصی مورد نظر ارسال خواهد شد .

کنترل و پیشگیری :

در این بیماری هیچ راه کنترل مشخصی برای کنترل عفونت در میان جمعیت ماهیان وحشی تاکنون گزارش نشده است . تنها راه ممکن کاهش میزان عیار ویروس در محیط با استفاده از خارج نمودن ماهیان مبتلا از محیط ، استریل نمودن آنان با محلول کلر و سپس دفن آنان و یا سوزاندن مبتلایان می باشد(توصیه های Prof .Chi Shau chi در مکاتبات اخیر)

(این امر با توجه به وقوع عارضه در اکوسیستم طبیعی دریای خزر بسیار پیچیده ، هزینه بر و دارای مشکلات اجرایی فراوان بوده و نیاز به تمهیدات خاصی دارد که امکانات فعلی موسسه پاسخگوی این نیاز نمی باشد)

لیکن در خصوص محیط های پرورشی جهت کنترل بیماری (VNN) روش های عملی تری توصیه شده است . از جمله جهت پیشگیری از انتقال عمودی بیماری ،استفاده از مولدین عاری از ویروس و ضد عفونی تخم ها توسط ازن و یا اشعه UV و جهت پیشگیری از انتقال افقی بیماری ، ضد عفونی آب مصرفی مزارع توصیه می گردد.

در حال حاضر استـــفاده از واکسن های نوترکیب (Recombinant) حاصل از پروتیئن پوشینهٔ ویروس (capsid protein) در مراحل آزمایش اولیه بوده و بصورت تجاری در دسترس نمی باشد.

درمان :

همچون سایر بیماری های ویروسی آبزیان ، هیچگونه درمانی برای ماهیان مبتلا وجود ندارد.

تشکر و قدردانی :

در انجام این بررسی همکاران عزیزی سهیم بوده اند که شایسته است با ذکر نام و در نهایت قدر شناسی، مورد تقدیر و تشکر قرار گیرند ، از آقای دکتر مهدی سلطانی که با همکاری صمیمانه و همیشگی خود انجام آزمایشات باکتریولوژی و مراحل آماده سازی نمونه ها را درآزمایشگاه بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تقبل فرمودند، از آقای دکتر عیسی شریف پور که در بازدید و نمونه برداری از منطقه و بررسی مقاطع آسیب شناسی با دقت و حوصله بسیار همراهی نمودند، از آقای دکتر مصطفی شریف روحانی به پاس حمایت و همدلی های ایشان ، ازآقای دکتر علی اصغر سعیدی وهمکاران محترم در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که عملیات خونگیری و بررسیهای هماتولوژیک و تست بیماریزایی را قبول زحمت فرمودند تقدیر و تشکر می گردد.

همچنین ازکلیه همکاران مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی ، مسئولین مرکز و بویژه همکاران بخش بهداشت و بیماری های آبزیان و بخش اکولوژی مرکز و نیزهمکاران عزیزبخش مدیریت ذخایر موسسه که از ابتدای وقوع عارضه مجدانه ،همراهی نموده و با ارسال اطلاعات مورد نیازززینت بخش این مجموعه شدند و نیز دانشجوی ساعی خانم شیوا شمس که در تهیه منابع و تصاویر بیماری قبول زحمت نمودند و آقای هادی باقری کارشناس محترم آزمایشگاه بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به پاس زحمات ایشان در آماده سازی نمونه ها، به سهم خود تشکر و قدردانی می گردد. همچنین از همکاران برون مرزی این بررسی ، Prof.Nakai از مرکز رفرانس بیماری VNN در کشور ژاپن و Prof. Shau chi از کشور تایوان که در انجام آزمایشات تشخیصی و ارسال اطلاعات مورد نیاز صمیمانه همکاری نمودند و نیز Dr. Igor shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (VNIIPRH) کشور روسیه به پاس محبت های همیشگی ایشان ، تقدیر و تشکر می گردد.

از زحمات همکاران امور اداری موسسه نیز به خاطرارسال نمونه ها و تایپ گزارش سپاسگزاری می گردد.

منابع

1. Chi Shau chi , Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. & Chen S.N.(1997). Mass mortalities associated with nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *E. akaara* (Temminck & Schlegal) .*J.Fish Dis*.,**20**,185-193.
2. Fukuda Y., Neguyen H.D., Funuhashi M. & Nakai T. (1990) Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis .*Fish Pathol*., **31** , 165-170 .
3. Iwamoto T., Mise K., Mori K., Arimoto M., Nakai T.& Okuno T (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for *striped jack nervous necrosis virus*, the type species of the *Betanodavirus ,J.Gen Virol*., **82**, 2653-2662.
4. Mori K., Nakai T., Murogo K., Arimoto M.,Mekuchi T.,& Kanno T.(1991). A viral disease in hatchery –reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol*., **26**, 209-210.
5. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2003), Part 2, Section 2.1, Chapter 2.1.7., Office International Epizootic **(O.I.E)** .
6. Nakai T., Neguyen H.D., Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M., & Ootsuki K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer .*Fish Pathol.*, **29**, 211-212.
7. Nishizawa T. ,Mori K., Nakai T., Furusava I., & Murogo K.,(1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat.Org.,* **18**, 103-107.

:

پیوست شماره ۵- نتایج دریافتی از آزمایشگاه رفرانس Office International Epizootic (O.I.E) کشور ایتالیا جهت آزمایشات ایمیونوهیستوشیمی

National Reference Laboratory
for Fish diseases and OIE Reference Laboratory for Encephalopathy and Retinopathy

Viale dell'Università , 10 – 35020 LEGNARO (PD)

DOC. No.: 277/ V10

APPLICANT: IRAN FISHERIES RESEARCH ORGANISATION; Dr. Abbas Ali Motalebi

SAMPLES: Sturgeon fry and *Mugil Klunzingeri* **ORIGIN**: IRAN

Iran Fisheries Research Organisation Identification N°	N° IZS Ve	Tissue	Species	Histology	IHC for Nodavirus	Real-time PCR for Nodavirus
19/1	277/1	Eye	Sturgeon	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
19/1	277/2	Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed
19/2	277/3	Eye	Sturgeon	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
19/2	277/4	Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed
19/3	277/5	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed
19/4	277/6	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Negative
19/5	277/7	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Negative
19/6	277/8	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed
19/7	277/9	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed
19/8	277/10	Eye + Brain	Sturgeon	Presence of vacuolisations widespread in the encephalon and spinal cord	Negative	Not performed

Iran Fisheries Research Organisation Identification N°	N° IZS Ve	Tissue	Species	Histology	IHC for Nodavirus	Real-time PCR for Nodavirus
19/9	277/11	Eye	Sturgeon	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
19/10	277/12	Eye	Sturgeon	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
20/1	277/13	Eye	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
20/2	277/14	Eye	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
20/3	277/15	Eye	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
20/4	277/16	Eye	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
20/5	277/17	Eye	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
21/1	277/18	Brain	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
21/2	277/19	Brain	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
21/3	277/20	Brain	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
21/4	277/21	Brain	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
22/1	277/22	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
22/2	277/23	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
22/3	277/24	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
22/4	277/25	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
22/5	277/26	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
23	277/27	Gills	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
24	277/28	Brain	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
25/1	277/29	Spleen	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
25/2	277/30	Spleen	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
26/1	277/31	Intestin	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample

Iran Fisheries Research Organisation Identification N°	N° IZS Ve	Tissue	Species	Histology	IHC for Nodavirus	Real-time PCR for Nodavirus
26/2	277/32	Intestin	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample
27	277/33	Liver	*Mugil klunzingeri*	Unsuitable sample	Unsuitable sample	Unsuitable sample

A lot of samples were in bad status of conservation. It wasn't possible to differentiate lesions caused by the conservation status from ones derived by potential pathogens.

Legnaro Padua, 26 july 2010

Dr. Giuseppe Bovo ; Dr Terregino Calogero

Abstract:

Viral Nervous Necrosis (VNN) is a worldwide disease affecting several species of cultured marine fish. For the past two decades, betanodavirus infections that cause Viral Nervous Necrosis (VNN) have emerged as major constraints on the culture and sea ranching of marine fish in almost all parts of the world. More than forty species mainly of marine origin have been so far affected and this number is likely to rise in future following the introduction of new species and the increase of aquaculture trade.

Unknown acute mortality occurred in wild golden grey mullet *Lisa auratus* and *Liza saliens* in Iranian waters of Caspian Sea in recent years. In order to isolation and confirmation of causative agents of golden grey mullet mortality in the Caspian Sea, a complementary research investigation project was designed in 2005 and approved immediately in Iranian Fisheries Research Organization (IFRO). Many diagnostic aspects such as Virology (Cell culture and Elctereone Microscopy), Hemathology, Bacteriology, Histopathology, Molecular biology (Nested-RT-PCR), Heavy metals measuerment and Serology (IFAT and IHC) were employed in mentioned multidiciplinary project. About 322 moribund fish samples which revealed skin darkening, erratic swimming behavior such as spiral and belly-up at rest and high distention of swimming bladder. Suspected samples were collected from coastal capture sites in iranian north proviences in 2006 till 2009. Targets tissue such as brain and eye were removed in strile condition and then kept in -80^{oC} frezzer for cell culture and Nested-RT-PCR. Other tissue samples from liver, kidney, intestine, stomach, gill, skin and muscle, gall bladder and gonads were taken and fixed in 10% buffer formalin and same parts fixed in glutaraldehyde 3% for histopathology, IHC and EM respectively. Cytopathic effect (CPE) was observed in those cell cultures just six days after inoculation with the dilutions of the tested 312 homogenate supernatants. CPE in monolayers of cells cultured (SSN-1 cell line) was characterised by thin or rounded, refractile, granular cells with vacuoles. Nine samples were positive in virology assay. Nested- RT-PCR was done on suspected tissue samples and supernatant of CPE positive samples and 21 tissue samples and all CPE positive samples were positive. IFAT was selected as a confirmatory method for identifying viral strains replicating on cell cultures and carried out with rabbit anti-betanodavirus serum on suspected tissue samples and some smears of CPE positive samples. Some bright points approved betanodavirus antigen and confirmed cell culture and Nested-RT-PCR findings.

In fixed tissue samples widespread and massive vacuolation were observed in brain, spinal cord, retina and optical nerve. In order to confirmation of diagnostic findings , IHC was done with monoclonal antibody anti-betanodavirus and some red-brown points were observed. Theses findings revealed expected viral antigens and confirmed previous results. Moreover, virus particles with 25-30 nm in diameter were visualized in infected brain and retina using positive staining in TEM. Also pathogenicity test was employed to confirm the obtained results. So Guppy fish *Poecilia reticulata* and sturgeon fry were used instead of the experimental host due to ease of handling and susceptibility. After 15 days post infection, guppy bathed in VNN-infected tissue culture with 10^4 $TCID_{50}$ showed clinical signs similar to naturally infected Golden grey mullet, and the mortality rate reached up to 100% in 75 dpi. When target organs were examined by cell culture isolation, serology, and histopathology, all revealed the presence of virus in the Guppy. Suspected supernatant injected to sturgeon fry through intravitreous injection and widespread vacuolation were observed in brain and spinal cord buy IHC and Real time PCR were negative. In conclusion, with attntion to obtained results in this investigation such as ecological factors, clinical signs, histopathological, virological and bacteriological results, molecular analysis, (IHC, IFAT, PCR), TEM demonstration, serological and hematological findings, it could be confirmed that VNNV was the main causative agent for disease outbreak in Golden grey mullet in Southern coastline of Caspian Sea.

Key words: Viral nervous necrosis, Golden grey mullet, *Liza aurata* , *Liza saliens*, histopathology , virology, bacteriology, IHC, IFAT, PCR,TEM, Caspian Sea, Iran

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Project Title : Study on Viral Nervouse Necrosis (Isolation, Characterisation and Pathogenesis) in Golden grey mullet in the Caspian Sea and study of pathogenecity and possibility of transmission to the other fish species (Sturgeon fishes, *Rutilus frisii kutum* and reared Rainbow trout and Carp).
Apprpved Number:0-100- 200000- 05- 0000- 85015
Author: Seyed Jalil Zorriehzahra
Project leader : Seyed Jalil Zorriehzahra
Author province:M.Ghiasi(Caspian Sea Ecology Research Center),S.Haghighi(International Sturgeon Research Institute),M.Ghasemi(Inland Waters Aquaculture Research Center)
Collaborators:E.Sharifpor,S.A.Ghorshi,E.Saberfar,M.Sharifrohani,J.Najafi,P.Seifori,Sh.Behrozi,F.Laloei,A.R.Shenavarmasoleh,J.Masomzadeh,M.Mehizadeh,M.R.Mirhasheminasab,K.Asgharnia,R.Salehitabar,Sh.Kakolaki,S.Bazarimoghadam,A.Halajian,M.Alizadeh,J.Jalilpor,F.Chakmehdoz,H.Nezamabadi,M.Fanid,A.A.Saeidi,M.Binaei,M.Nayerani,A.Zahedi,A.R.Nazari, B.Mokhbermaleki,B.Ramezani,R.Nahrvar,J.Daghighrohi,A.Nori,Gh.Darvishi,A.Bari,F.Farahtaj,M.Soltani
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2006
Period of execution : 4 Years
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2014***

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Project Title :

Study on Viral Nervouse Necrosis (Isolation, Characterisation and Pathogenesis) in Golden grey mullet in the Caspian Sea and study of pathogenecity and possibility of transmission to the other fish species (Sturgeon fishes, *Rutilus frisii kutum* and reared Rainbow trout and Carp).

Project leader :
Seyed Jalil Zorriehzahra

Register NO.
43010