

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی

عنوان:

**بررسی علل احتمالی ویروسی تلفات  
ماهیان کپور نقره ای و آمور پرورشی  
در استان گیلان**

مجری:

محدث قاسمی

شماره ثبت

۵۲۱۲۴

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبیاری پروری آبهای داخلی

عنوان طرح/ پروژه: بررسی علل احتمالی ویروسی تلفات ماهیان کپور نقره ای و آمور پرورشی در استان گیلان

کد مصوب: ۹۶۱۶۸-۱۲-۷۳-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محدث قاسمی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان: محدث قاسمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): عیسی شریف پور، سیدجلیل ذریه زهرا، مصطفی شریف روحانی، شاپور کاکولکی، مهدی مرادی، شهرام بهمنش، سهراب دژندیان، جواد دقیق روحی، سمیه حقیقی کارسیدانی، حسن نظام آبادی، بابک رضائی عاقله، منیره فتید، محدثه احمدنژاد، مهرداد اصغر نیا، معصومه امینی، ابوالفضل سپهداری، جمال نجفی، فریدون چکمه دوز، علیرضا افراز، عباس نوری

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان گیلان

تاریخ شروع: ۸۹/۱۰/۱

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۶

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»

طرح / پروژه: بررسی علل احتمالی ویروسی تلفات ماهیان کپور

نقره ای و آمور پرورشی در استان گیلان

کد مصوب: ۹۶۱۶۸-۱۲-۷۳-۲

شماره ثبت (فروست): ۵۲۱۲۴ تاریخ: ۹۶/۵/۱۴

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محدث قاسمی دارای مدرک  
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان  
می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان  
در تاریخ ۱۳۹۵/۱۲/۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید  
گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت کارشناس در پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی  
مشغول بوده است.

۱.....		چکیده
۳.....		۱- مقدمه
۴.....		۱-۱- کپور ماهیان (Cyprinidae)
۴.....		۱-۲- تاریخچه پرورش ماهی در ایران
۵.....		۱-۳- تاریخچه پرورش ماهیان گرم آبی در استان گیلان
۵.....		۱-۴- مهمترین گونه های کپور ماهیان پرورشی در ایران
۸.....		۱-۵- رابدو ویروس ها
۲۸.....		۱-۶- بیماری هرپس ویروس (KHV) Koi herpes virus disease
۲۹.....		۱-۷- بیماری رثو ویروسی ماهی آمور (GCRV)
۳۰.....		۲- مواد و روش کار
۳۰.....		۲-۱- مواد مصرفی
۳۱.....		۲-۲- لوازم غیر مصرفی
۳۱.....		۲-۳- روش کار
۳۱.....		۲-۳-۱- نمونه برداری و بررسی علائم بالینی ماهیان
۳۴.....		۲-۳-۲- کشت سلول
۳۷.....		۲-۳-۳- آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR
۴۱.....		۲-۳-۴- واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس (RT-PCR)
۴۲.....		۲-۳-۵- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمر اختصاصی KHV
۴۲.....		۲-۳-۶- آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرز (Nested-RT-PCR) با استفاده از کیت تجاری IQ2000 ( تایوان )
۴۴.....		۲-۳-۷- انجام Nested-PCR
۴۴.....		۲-۳-۸- الکتروفورز محصول PCR و عسکرداری از ژل آگاروز
۴۵.....		۲-۳-۹- آزمایش آسیب شناسی بافتی
۴۶.....		۲-۳-۱۰- میکروسکوپ الکترونی
۴۶.....		۲-۳-۱۱- مطالعات بیماریزایی (Pathogenicity)

صفحه	عنوان	« فهرست مندرجات »
۴۷.....	۱۲-۳-۲- کشت باکتری .....	
۴۸.....	۳- نتایج .....	
۴۸.....	۱-۳- مشاهدات بالینی .....	
۵۲.....	۲-۳- شرایط عمومی آب استخرها .....	
۵۴.....	۳-۳- کشت سلولی .....	
۵۸.....	۴-۳- آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم .....	
۶۰.....	۵-۳- RT-PCR و PCR .....	
۶۴.....	۶-۳- آسیب شناسی بافتی .....	
۶۷.....	۷-۳- مطالعات بیماری‌زایی (Pathogenicity) .....	
۶۷.....	۸-۳- آزمایشات باکتری شناسی .....	
۶۸.....	۴- بحث .....	
۷۲.....	پیشنهادها .....	
۷۴.....	منابع .....	
۷۸.....	چکیده انگلیسی .....	

## چکیده

توسعه پرورش ماهیان گرمابی در کشور همراه با واردات تخم چشم زده، مولدین و ماهیان زینتی و انتقال بچه ماهی و مولدین از استانی به استان دیگر موجب گسترش ناخواسته برخی بیماری ها شده است. بر اساس گزارش شیلات استان گیلان آمار تلفات ماهیان فیتوفاگک در تابستان ۱۳۸۹ نشان دهنده وقوع بیش از ۱۱۶۲ تن تلفات ماهیان فیتوفاگک بوده که ارزش ریالی آن بیش از بیست و سه میلیارد ریال می باشد که این میزان حدود ۴۰ میلیارد ریال در سال ۱۳۹۱ محاسبه گردید (آمار غیر رسمی شیلات استان گیلان). همچنین در برخی مزارع تلفات محدود تر ماهیان آموگزارش می شود. مجموعه علائم مشاهده شده و شدت تلفات، احتمال وجود بیماری های ویروسی مانند ویرمی بهاره کپور، بیماری هرپس ویروسی و بیماری رئوویروسی ماهی آموگزارش را افزایش داد. در تحقیق حاضر ضمن مراجعه به مزارع استان گیلان در زمان بروز تلفات شدید طی فصل پرورش در سالهای ۹۱-۱۳۹۰، نمونه برداری از ۴۱۱ قطعه ماهی فیتوفاگک و آموگزارای علائم بالینی با محدوده وزنی ۵ تا ۲۳۰۰ گرم از ۸۳ مزرعه صورت گرفت. علائم بالینی در مزارع متفاوت بوده و در خونریزی های زیر جلدی در پهلوها، پایه باله ها یا در کل باله و قرمز شدن زیر شکم و روی سرپوش آبششی، آگروفتالمی خفیف، خونابه در محوطه شکمی (به رنگ های زرد، شفاف یا قرمز) و خونریزی های نقطه ای بر روی امعاء و احشاء و بیحالی در ماهیان فیتوفاگک و در برخی موارد زرد یا کمرنگ شدن کامل پوست مشاهده شد و در تعداد کمی از ماهیان آموگزارای علائم خونریزی های نقطه ای پوست و احشاء و آسیت (آب آوردگی) در محوطه شکمی و در برخی ماهیان فیتوفاگک و آموگزار نیز کبد و آبشش کمرنگ مشاهده گردید. در موارد معدودی حالت تورم و پختگی در عضلات ماهی فیتوفاگک دیده شد. در خصوص بچه ماهیان موارد متعددی از لاغری مفرط مشاهده شد. تفاوت در علائم بالینی می تواند نشانگر وجود علل متفاوت تلفات در مزارع مختلف باشد. رنگ آب در استخرهای دارای تلفات نیز تفاوت داشته و از کاملاً شفاف تا سبز زیتونی، زرد یا کمی قهوه ای متفاوت بود که نشان از اختلاف مدیریت کلی پرورش از جمله مدیریت کیفیت آب می باشد. حداقل عمق قابل مشاهده با صفحه سکشی در مزارع ۴۰ سانتی متر تا یک متر بود. استخرهایی که از منبع چاه نیمه عمیق یا عمیق به عنوان منبع آبی استفاده می کردند در مقایسه با آنها که از آب کانال و رودخانه بهره مند بودند تلفات بسیار کمتری داشتند. میانگین دمای آب، اکسیژن و pH در مزارع به ترتیب °C ۳۱-۲۶/۵، ۴/۳-۵/۷ mg/L و ۷/۴-۹/۳۸ بود. به منظور بررسی های ویروس شناسی، نمونه برداری از اندامهای داخلی شامل کلیه و طحال انجام شد و هوموژن بافت های هدف پس از گذراندن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون بر روی تیره های سلولی EPC و BF2 تلقیح گردید تا در صورت مشاهده اثرات آسیب سلولی مراحل تایید تشخیص به کمک روشهای آنتی بادی درخشان، RT-PCR و PCR انجام شود. در کشت سلولی، آثار تخریب سلولی مشکوک به بیماری SVC پس از تلقیح هوموژن بافتی ۳ ماهی فیتوفاگک بر روی تک لایه سلولی EPC بدست آمد ولی در پاساژهای بعدی علائم آسیب سلولی ایجاد نگردید. در خصوص نمونه های آموگزار نیز هیچگونه آثار آسیب سلولی بر روی دو تیره سلولی EPC و BF2 ایجاد نشد. در آزمایش آنتی

بادی درخشان غیر مستقیم نیز که ۷۲ ساعت پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهی فیتوفاگک و آمور بر روی تک لایه سلولی EPC انجام شد، هیچگونه واکنشی مشاهده نگردید. در روش PCR و RT-PCR تمام نمونه های فیتوفاگک و آمور از نظر بیماری های SVC و KHV و نمونه های آمور از نظر وجود بیماری GCRV با استفاده از جفت پرایمر های اختصاصی آزمایش شدند. بعلاوه به طور همزمان از کیت های تجاری تشخیص SVC و KHV (IQ2000) استفاده شد. نتایج تمام آزمایشات PCR و RT-PCR حاکی از عدم وجود RNA رابدو ویروس کارپیو، رئوویروس و DNA هرپس ویروس کوی در نمونه های مورد آزمایش بود. به این ترتیب که در PCR دستی باند ۴۷۰ bp مربوط به SVCV، باند ۲۹۲ bp و باندهای ۶۹۷ bp و ۳۲۰ bp مربوط به GCRV در هیچیک از نمونه ها تایید نشد و به همین صورت در الکتروفورز محصول PCR مربوط به کیت های IQ2000 به ترتیب باندهای منفی ۴۷۱ bp و ۶۴۰ مشاهده شد و باندهای مثبت ایجاد نگردید. به منظور تایید نتایج، ۳ نمونه مشکوک به آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا ارسال گردید که هیچیک از بیماری های مذکور تایید نشد. به طور همزمان بر روی نمونه های ۲۶ کارگاه آزمایش تشخیص عوامل باکتریایی با کشت از بافت های کلیه و طحال بر روی آگار خوندار انجام شد. در آزمایشات کشت و بیوشیمیایی ۲۱ جدایه آئروموناس هیدروفیلا و ۶ جدایه جنس سودوموناس تشخیص داده شد در حالیکه از همان نمونه ها هیچگونه ویروسی تایید نگردید.

بر اساس نتایج کشت بر روی دو تیره سلولی و آزمایشات PCR، RT-PCR و IFAT حضور عوامل ویروسی SVC، KHV و GCRV در نمونه های مورد آزمایش در این تحقیق تایید نگردید و علت تلفات در بسیاری از مزارع مربوط به عوامل ویروسی نبوده و با مدیریت بهداشتی مزارع قابل کنترل و پیشگیری می باشد.

**واژگان کلیدی:** کپور ماهیان، فیتوفاگک، آمور، بیماریهای ویروسی، SVC، KHV، GCHV

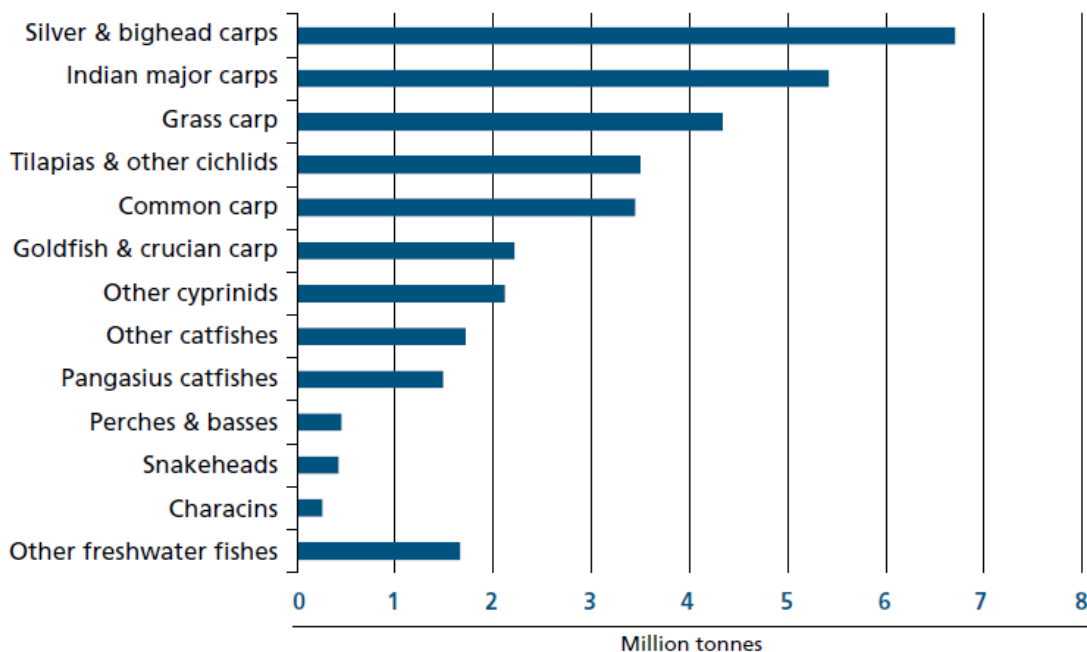
## ۱- مقدمه

تولید و پرورش ماهیان گرم آبی در کشور در سال های اخیر به دلیل نیاز به تامین منابع پروتئین حیوانی به سرعت گسترش یافته اما زیرساخت های بهداشتی و کنترل بیماری ها متناسب با آن توسعه پیدا نکرده است. تولیدات جهانی ماهیان آب شیرین در سال ۲۰۱۱ بیش از ۴۷ میلیون تن گزارش شده که حدود ۵۰ درصد آن مربوط به کپور ماهیان می باشد (FAO, 2012). از این میان میزان تولید ماهیان گرم آبی پرورشی ایران در سال ۱۳۹۱ به بیش از ۱۵۴ هزار تن رسیده که سهم استان گیلان حدود ۳۹ هزار تن می باشد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۲). از عوامل موثر بر افزایش تلفات و کاهش تولید می توان به ضعف مدیریت بهداشتی مزارع همراه با نقص مدیریت آب و تغذیه و عدم رعایت اصول بهداشتی در هنگام واردات و نقل و انتقال ماهیان زینتی و پرورشی اشاره نمود که موجب ورود عوامل بیماری زا به کشور و جابجایی در بین مزارع و استان های مختلف می گردد. در این میان شایع ترین عوامل بیماری زا، عوامل باکتریایی و ویروسی هستند که نقش عوامل ویروسی به دلیل درمان ناپذیری و سرعت انتقال و شدت بیماری زایی و امکان تشخیص دشوار بسیار مهم تر بوده و بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت حیوانات (Office International des Epizooties)، ۹ بیماری مسری لازم الاخطار تعیین گردیده است (OIE, 2012) که بیماری های ویرمی بهاره کپور (SVC) و بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی (KHV) از بیماری های ویروسی ماهیان گرمابی در این لیست قرار دارند. این پژوهش به دنبال بروز تلفات ماهیان فیتوفاگک *Hypophthalmichthys molitrix* و به میزان کمتر آمو *Ctenopharyngoon idella* پرورشی باعلائم خونریزی های زیر جلدی و در پایه باله ها و آسیت در کارگاه های پرورش ماهیان گرمابی استان گیلان با هدف جداسازی و شناسایی عوامل ویروسی از اندام های داخلی کلیه، کبد و طحال انجام شد. تلفات ماهیان مذکور به عنوان مشکل عمده پرورش دهندگان ماهیان گرمابی در سال های اخیر بویژه در فصول بهار و تابستان در استان گیلان است و طبق آمار غیر رسمی شیلات گیلان میزان تلفات ماهیان فیتوفاگک در تابستان ۱۳۸۹ بیش از ۱۱۶۲ تن با ارزش ریالی بیش از بیست و سه میلیارد ریال بود که در سال ۱۳۹۱ ۴۰ میلیارد ریال تخمین زده شد. در استخرهای گرمابی ۴ گونه فیتوفاگک، سرگنده، آمو و کپور در کنار یکدیگر پرورش داده می شوند که از این میان ۷۰٪ جمعیت ماهیان را ماهیان فیتوفاگک تشکیل می دهند. تلفات ماهی فیتوفاگک، به عنوان حساس ترین گونه با گرم شدن هوا در اواخر خرداد و اوایل تیر آغاز می شود ولی در اواسط مرداد ماه که دما به شدت بالا رفته است، تلفات در سه گونه دیگر نیز قابل مشاهده است ولی بیشترین میزان تلفات مربوط به ماهی فیتوفاگک است. بر اساس پیشنهاد سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) روش های مختلفی برای شناسایی ویروس ها ذکر شده که شامل کشت سلولی، RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)، IFAT (Imunoflouresent antibody test)، NT (Neutralization test) و ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) می باشد. لذا در این تحقیق پس از تلقیح هومورژن بافتی بر روی دو تیره سلولی EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) و BF2 (Bluegill fry) نمونه ها به روش های RT-PCR و IFAT آزمایش شدند.



### ۱-۱- کپور ماهیان (Cyprinidae)

خانواده کپور ماهیان بزرگ‌ترین خانواده ماهیان استخوانی را با بیش از ۲۴۰۰ گونه و ۲۲۰ جنس تشکیل می‌دهند. این ماهیان ساکن آمریکای شمالی، آفریقا، اروپا و آسیا می‌باشند. طول آنان در برخی از گونه‌ها گاهی به ۳ متر می‌رسد. همه کپور ماهیان تخم‌گذار بوده و اغلب از تخم‌های خود حفاظت نمی‌نمایند. اگرچه برخی از گونه‌ها برای حفاظت از تخم‌های خود، لانه‌ای برای آنان می‌سازند. اغلب کپور ماهیان از بی مهرگان آبی و گیاهان تغذیه می‌نمایند. البته برخی از گونه‌ها صرفاً از گیاهان آبی تغذیه می‌کنند. دسته بزرگی از کپور ماهیان جهت مصارف تغذیه‌ای انسان پرورش داده می‌شوند. این ماهیان مهم‌ترین و بزرگ‌ترین ماهیان پرورشی جهت تغذیه انسان به شمار می‌روند (شکل ۱-۱). همچنین برخی از گونه‌ها جهت کنترل بیولوژیک آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی از کپور ماهیان نیز جنبه زینتی داشته و جهت نگهداری در آکواریوم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این خانواده ماهی زبرا (*Danio rerio*) به عنوان مدل بیولوژیک تحقیقاتی جهت مطالعه بر روی کپور ماهیان، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Sanderse et al. 2003).



شکل ۱- تولید جهانی گونه‌های مختلف ماهیان پرورشی جهت مصارف تغذیه‌ای در سال ۲۰۱۲ (آمار سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد)

### ۱-۲- تاریخچه پرورش ماهی در ایران

علی‌رغم قدمت بسیار طولانی این صنعت به ویژه تکثیر و پرورش گونه‌های مختلف کپور ماهیان در جهان این فعالیت در ایران با تکثیر تاس ماهیان در سال ۱۳۰۱ و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال ۱۳۳۸ شروع شده است. مهم‌ترین گونه‌های کپور ماهیان پرورشی (ماهیان گرمابی) در ایران شامل کپور علفخوار یا آمور

*Ctenopharyngodon idella*، کپور نقره ای *molitrix Hypophthalmictis molitrix*، کپور سرگنده *Aristichthys nobilis* و کپور معمولی *Cyprinus carpio* است (خوش خلق، ۱۳۸۴). سطح زیر کشت ماهیان گرمابی در کشور در سال ۱۳۹۱ حدود ۵۰۸۵۳ هکتار و میزان تولیدات ماهیان گرمابی در سال ۱۳۹۱ حدود ۴۳۴۵۳ تن اعلام گردید (سالنامه آماری شیلات ایران ۹۱-۸۱).

### ۳-۱- تاریخچه پرورش ماهیان گرم آبی در استان گیلان

آغاز پرورش ماهی به صورت صنعتی در زمینه انواع کپور ماهیان از دهه ۵۰ با معرفی و اقدامات پرورش ماهی به صورت انبوه و تجاری برای اولین بار در سطح کشور از سوی شرکت دامپروری و کشاورزی سفید رود در اراضی این شرکت در حوزه رشت به انجام رسید و تا سال ۱۳۵۷ ضمن تولید در این مرکز معرفی آن به تعدادی از مراکز بخش خصوصی نیز صورت گرفت (آذری تاکامی، ۱۳۷۶).

میزان تولید ماهیان گرمابی در استان گیلان در سال ۱۳۸۱، ۱۵۶۳۵ تن گزارش شد که با روند صعودی به میزان ۳۱۷۱۴ تن در سال ۱۳۸۹ و ۳۸۴۹۶ تن در سال ۱۳۹۱ رسید (سالنامه آماری شیلات ایران ۹۱-۸۱).

### ۴-۱- مهمترین گونه های کپور ماهیان پرورشی در ایران

#### ۱-۴-۱- کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

کپور معمولی یا Common carp از ابتدا بومی آسیای مرکزی بوده و این ماهی دارای دندان های حلقی ولی فاقد دندان بر روی فک ها می باشد. سر ماهی بدون فلس بوده و باله چربی در آن دیده نمی شود، حس شنوایی در این ماهی قوی است. این ماهی دارای دو جفت سیبلیک است که یک جفت آن طویل و جفت دیگر کوتاه است. کپور وحشی دارای بدنی کشیده است که از طرفین کمی فشرده می باشد (پیغان و مشائی، ۱۳۸۴).



شکل ۱-۲- ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

(منبع عکس: اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر)

### ۲-۴-۱- کپور علفخوار (آمور) *Ctenopharyngodon idella*

در بازارهای محلی به آن آمور یا سفید پرورشی (Grass carp) می‌گویند. این گونه ماهی دارای بدنی کشیده و از طرفین پهن شده است. سرماهی از بالا به پایین فشرده و پهن و رنگ بدن سفید متمایل به سبز می‌باشد. ماهی آمور فاقد سیلک می‌باشد و دارای باله پشتی کوتاهی است. دهان نسبتاً زیرین و دندان‌های حلقی آن دو ردیفی می‌باشد. محل اصلی زندگی این ماهی در رودخانه آمور در کشور چین می‌باشد. این ماهی به خاطر رشد خوب در مناطق نسبتاً سرد و معتدل تا نواحی نیمه گرمسیری، امروزه در استخرهای خاکی پرورش داده می‌شود. این ماهی در رودخانه‌های با جریان‌های سریع زندگی می‌کند و در زادگاه اصلی خود (چین) در رودخانه‌های سیلابی با آب گل‌آلود و بستر پوشیده از سنگریزه به صورت دسته جمعی زندگی می‌کند. تخم‌ریزی این ماهی در دمای  $25-23^{\circ}\text{C}$  صورت می‌گیرد. ماهی آمور در دمای  $30-15^{\circ}\text{C}$  به تغذیه فعال می‌پردازد و رشد نسبتاً سریعی دارد. سن بلوغ آن ۲-۳ سالگی است (پیغان و مشائی، ۱۳۸۴).



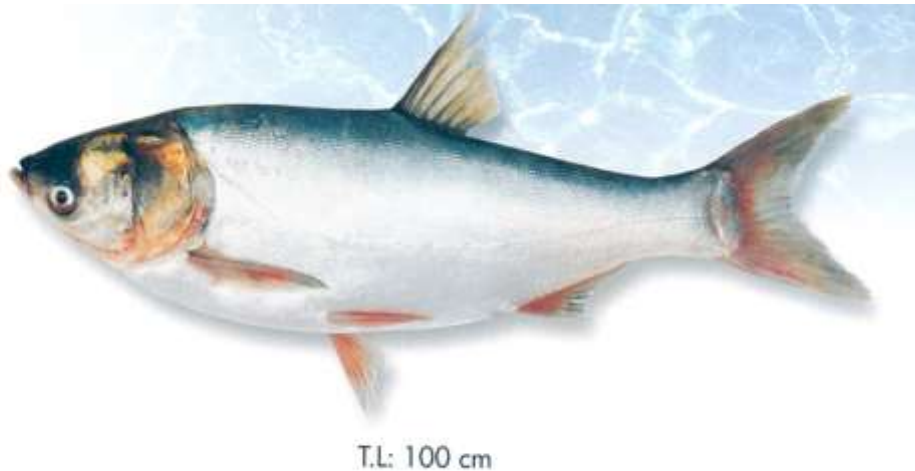
شکل ۱-۳- ماهی آمور پرورشی (*Ctenopharyngodon idella*)

(منبع عکس: اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر)

### ۳-۴-۱- کپور نقره‌ای (فیتوفاگ) *Hypophthalmichthys molitrix*

زیستگاه اصلی ماهی کپور نقره‌ای (Silver carp) نیز رودخانه‌های چین است. از مشخصات این ماهی داشتن فلس‌های کوچک نقره‌ای رنگ، بدن از دو جانب فشرده، دهان حالت فوقانی، دندان‌های حلقی یک ردیفی و یک تیغه که از نزدیکی مخرج ماهی تا پایین سر کشیده شده می‌باشد. نوزادان این ماهی تا سن چند روزگی از زی شناوران جانوری (روتیفر و ناپلی پاروپایان) تغذیه می‌کنند، ولی پس از آن، تغذیه عمدتاً از زی شناوران گیاهی صورت می‌گیرد. برای هماهنگی با این نوع تغذیه، خارهای آبششی حالت شبکه مانند پیدا کرده و روده‌ها بسیار

طویل (حدود ۱۵ برابر طول بدن) شده اند. رشد این ماهی در شرایط مساعد بسیار سریع است و به وزن ۲۰ کیلوگرم نیز می رسد. سن بلوغ این ماهی نیز شبیه کپور علفخوار است (پیغان و مشائی، ۱۳۸۴).



شکل ۱-۴- ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

(منبع عکس: اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر)

#### ۴-۱-۴- کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*)

زیستگاه اصلی ماهی سرگنده (Bighead carp) نیز، همانند دو گونه پیشین رودخانه های چین است. شبیه کپور نقره ای است، با این تفاوت که رنگ بدن آن تیره تر، باله سینه ای طویل تر و سر آن نسبتاً بزرگتر است. تیغه زیر شکم یا کیل در این ماهی کوتاه و ناقص است و تا ناحیه سر ادامه نمی یابد. عمدتاً از زی شناوران جانوری تغذیه می کند. نوزاد این ماهی از زی شناوران جانوری روتیفر و ناپلی تغذیه می کند. طول روده این ماهی نسبت به کپور نقره ای کوتاه تر است. تولید مثل آن شبیه کپور علفخوار و کپور نقره ای است. رعایت نسبت ۱ به ۵ بین ماهی کپور نقره ای و سرگنده در حفظ تعادل استخر از نظر وضعیت زی شناوران آب بسیار اهمیت دارد زیرا اگر این نسبت به هم بخورد چه بسا در غنی سازی استخر مشکل ایجاد شود و یا یک نوع از زی شناوران گیاهی یا جانوری غالبیت پیدا کنند که در اصطلاح، شکوفایی نامطلوب زی شناوران نامیده می شود (پیغان و مشائی، ۱۳۸۴).



شکل ۱-۵- ماهی کپور سرگنده پرورشی (*Aristichthys nobilis*)

(منبع عکس: اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر)

### ۵-۱-۱- رابدو ویروس

رابدو ویروس‌ها (*Rhabdovirus*) ویروس‌های RNA دار تک رشته‌ای و فشنگی شکلی هستند که بسیاری از آنان در زمره ویروس‌های بیماری‌زای ماهیان وحشی و ماهیان پرورشی قرار دارند. از جمله این ویروس‌ها می‌توان به HIRRV، Snake Head Rhabdovirus (SHRV)، Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)، Pike Fry، Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV)، Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)، HIRame، Rhabdovirus (PFRV) و Ulcerative Disease Rhabdovirus (UDRV)، اشاره نمود (Whitfield et al. 2011; Mork et al. 2004). برخی از این ویروس‌ها شامل IHNV، VHSV و SVCV در لیست ویروس‌های اخطار کردنی سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) قرار دارند. عفونت IHNV معمولاً در ماهیان سالمون و قزل‌آلا بروز می‌یابد (Bootland et al. 1999) و SVCV معمولاً در کپور ماهیان دیده می‌شود (Ahne et al. 2002) در حالی که طیف میزبانی VHSV همچنان در حال گسترش است (Al-Hussinee et al. 2011). این ویروس‌ها عامل تلفات عظیمی در ماهیان وحشی و پرورشی به شمار می‌روند.

### ۱-۵-۱-۱- تاکسونومی

خانواده رابدو ویریده مشتمل بر ویروس‌هایی هستند که دارای شباهت‌های مورفولوژیک و ژنتیکی با هم بوده و قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از میزبان‌های گیاهی و جانوری بوده و با بیش از ۱۶۰ گونه در شش جنس Vesiculo virus، Lyssa virus، Ephemero Virus، Novirhabdovirus، Cytorhabdovirus و Nucleorhabdovirus قرار می‌گیرند (Fu, 2005).

در بین رابدو ویروس‌های ماهیان، IHNV، VHSV، HIRRV و SHRV که در جنس Novirhabdovirus قرار دارند و SVCV که در جنس Vesiculo virus قرار دارد بیش از سایرین مورد توجه قرار گرفته‌اند.

## ۲-۵-۱- ویرمی بهاره کپور

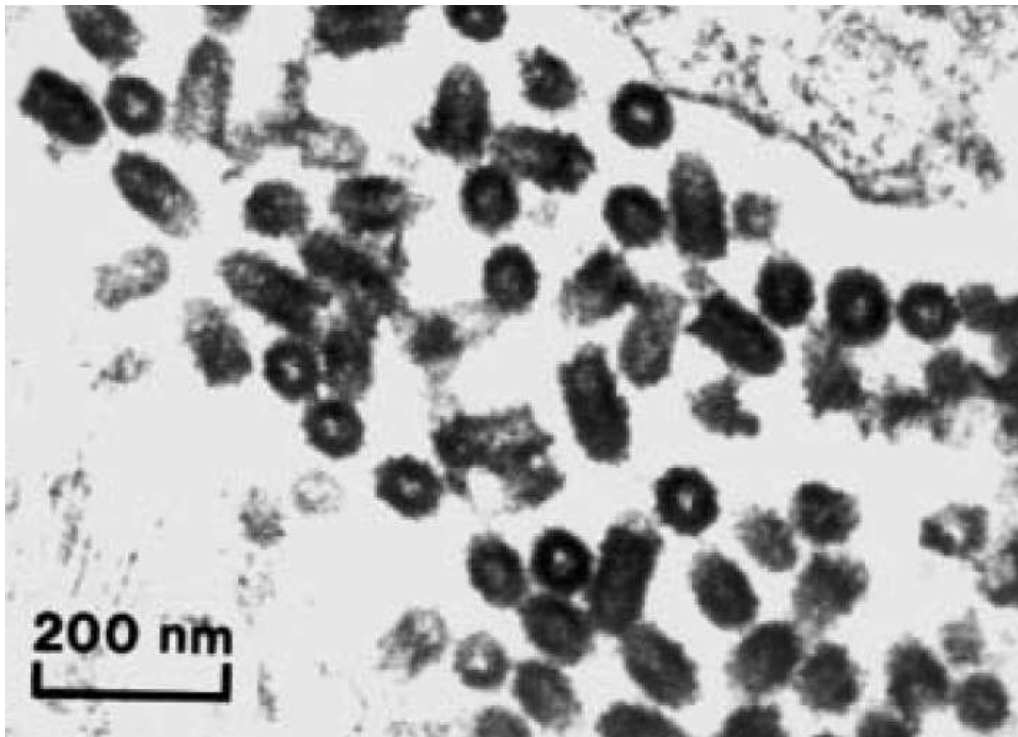
کنترل بیماری‌های ویروسی به دلیل حساسیت بالای ماهیان در سنین پایین و فقدان اطلاعات و اصول درمانی موثر علیه آنان مشکل است. سال‌ها پیش، مجموعه‌ای از بیماری‌های عفونی سبب مرگ و میر گسترده‌ای در کپور ماهیان بسیاری از مناطق دنیا و به ویژه اروپا می‌گردیدند (Fijan 1972, 1999). چنین بیماری‌هایی به واسطه عوامل باکتریایی و ویروسی ناشناخته ایجاد گردیده و منشاء خسارات اقتصادی وسیعی بودند. اولین بار نقش عوامل ویروسی در بروز این بیماری‌ها به کمک تکنیک‌های کشت سلولی و مشاهده بروز آثار آسیب سلولی (Cytopathic effect) نشان داده شد (Osadchaya 1964, Tomasec et al. 1964).

جهت تمایز بیماری‌های عفونی ویروسی از بیماری‌های مشابه باکتریایی در کپور ماهیان، نام ویرمی بهاره کپور (Spring Viremia of Carp) بر این بیماری گذاشته شد و عامل این بیماری، ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) با نام علمی Rhabdovirus carpio نام‌گذاری گردید (Fijan et al. 1971). این بیماری در اروپا بیماری التهاب کیسه شنا (Swimming bladder inflamaion) نام‌گذاری گردید (Arshanzia et al. 1968, Otte 1972).

ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) اولین بار در سال ۱۹۷۱ میلادی توسط Nicola Fijan معرفی گردید و طبق گزارشاتی که در همان زمان منتشر شد به نظر می‌رسد که عفونت SVCV به صورت آندمیک سال‌ها پیش از آن نیز وجود داشته است.

ویروس ویرمی بهاره کپور از اعضاء خانواده ویروسی Rhabdoviride بوده و در جنس vesiculovirus قرار دارد (Walker et al. 2000). جنس وزیکولو ویروس مشتمل بر ویروس‌های Vesiculo Stomatitis Virus (VSV) و همچنین چندین گونه ویروسی ماهیان از جمله Pike Fry Rhabdovirus (PFRV)، Ulcerative Disease Rhabdovirus، Eel Virus American (EVA) و Eel Virus European (EVEX) می‌باشد (Walker et al., 2000).

ویروس عامل ویرمی بهاره کپور همانند سایر ویروس‌های خانواده رابدو ویریده دارای ظاهری فشنگی شکل بوده و دارای نوکلئوکپسیدی با تقارن مارپیچی می‌باشد (شکل ۱-۶). قطر یک ذره کامل ویروسی (ویریون) ۹۰nm-۶۰ و طول آن ۱۸۰-۸۰nm می‌باشد. این ویروس در زمره ویروس‌های پوشینه دار به شمار می‌رود و به همین دلیل نسبت به عواملی همچون حرارت، اسید و موادی مثل اتر حساس می‌باشد (Ahne et al. 2002).



شکل ۱-۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی ویروس ویرمی بهاره کپور. ظاهر فشنگی شکل از مشخصات اصلی ویروس‌های خانواده رابدوویریده می‌باشد (Ahne et al., 2002).

### ۳-۵-۱- خصوصیات ژنومی SVCV

ویریون این ویروس حاوی یک مولکول خطی، تک رشته‌ای و منفی RNA می‌باشد که در غلظت ۲۰-۵ سوکروز با ضریب ۳۸-۴۰S رسوب می‌کند (Roy & Clewley 1978, Wu et al. 1987). همان‌طور که اشاره گردید ژنوم این ویروس متشکل از ۱۱۰۱۹ نوکلئوتید بوده و رمزکننده پنج پروتئین ساختاری و غیر ساختاری با ترتیب زیر می‌باشد: 3'- نوکلئوپروتئین (N)، فسفوپروتئین (P)، پروتئین ماتریکس (M)، گلیکوپروتئین (G) و RNA پلیمراز وابسته به RNA (L)-5'.

برخلاف بسیاری از رابدوویروس‌های ماهیان که در جنس Novirhabdovirus قرار دارند، SVCV فاقد ژن غیر ویریونی (NV) بین ژن‌های G و L می‌باشد (Kurath et al. 1997, Walker et al. 2000). اخیراً جزئیات زیادی از ساختار مولکولی این پروتئین‌ها شناخته شده است (جدول ۱-۱). پروتئین‌های P و N نقش اصلی را در رونویسی و همانند سازی ژنوم ویروس دارند در حالی که پروتئین G حاوی اپی‌توپ‌های آنتی ژنی بوده و هدف خوبی جهت طراحی DNA واکسن‌ها می‌باشد (Warg et al. 2007).

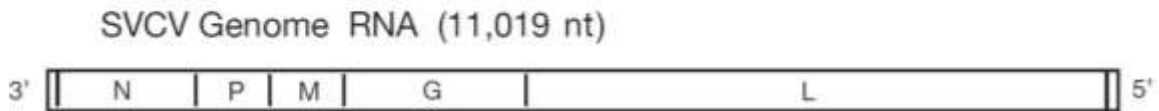
RNA پلیمراز وابسته به RNA نقش رونویسی و همانند سازی ژنوم این ویروس را در دمای بهینه ۲۵-۲۰ بر عهده دارد (Roy & Clewley 1978). رونویسی و همانند سازی هنگامی رخ می‌دهد که پروتئین L در ارتباط و برهم کنش با پروتئین‌های N و P باشد. گلیکوپروتئین G سازنده اسپایک‌های تریمری بر سطح ویروس می‌باشد که

وظیفه اتصال ویروس به گیرنده‌های سلولی و القاء اندوسیتوز را دارا است. این گلیکوپروتئین‌ها، آنتی ژن عمده ویروس را تشکیل داده و تعیین کننده خصوصیات سرولوژیک رابدوویروس‌ها می‌باشند. نوکلئوپروتئین N فراوان‌ترین پروتئین ویریون است که در برهم کنش با اسیدنوکلئیک ویروس، ساختار ماریچی نوکلئوکسپید را تشکیل داده و نقش مهمی در تنظیم رونویسی بر عهده دارد. حدود ۱/۳ پروتئین N در ارتباط با RNA ویروس می‌باشد (Sokol & Koprowski 1975). فسفوپروتئین نیز یکی از اجزا تشکیل دهنده نوکلئوکسپید ویروس به شمار رفته و وجودش جهت رونویسی ژنوم ضروری می‌باشد (Roy 1981). مانند سایر ویروس‌های این جنس، SVCV نیز دارای یک پروتئین غشایی (M) می‌باشد که تشکیل دهنده ساختار فشنگ مانند ویریون و عامل ارتباط نوکلئوکسپید با دومین‌های سیتوپلاسمی پروتئین G که درون پوشینه لیبیدی ویریون فرو رفته‌اند، است (Walker et al. 2000).

تعیین خصوصیات ژنومی SVCV از سال ۱۹۸۴ با تعیین توالی ژن M و توالی ۷۰ نوکلئوتیدی انتهای 3' ژنومی آغاز گردید (Kiuchi & Roy 1984, Roy et al. 1981). در ادامه در سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶، توالی کامل ژن G و بخشی از توالی ژن L و همچنین توالی‌های بین ژنی تعیین گردید (Bjorklund et al. 1995, 1996). همان‌طور که اشاره شد ردیف ژن‌های این ویروس به صورت '3'-LGMPN-5' است که از این نظر مشابه ویروس‌های جنس Vesiculovirus و Lyssa virus می‌باشد. توالی‌های بین ژنی این ویروس بسیار حفاظت شده بوده و دارای سیگنال‌های پایان رونویسی و پلی آدنین با توالی TATG(A)7 در انتهای هر ژن می‌باشد (شکل ۱-۷). علاوه بر این، یک سیگنال آغاز رونویسی با توالی AACAG در ابتدای ژن‌های بعدی دیده می‌شود. نواحی غیرقابل رونویسی بین ژنی این ویروس مشتمل بر دی نوکلئوتیدهای CT می‌باشند به استثناء تلاقی ژن‌های G و L که دارای تترانوکلئوتیدهای CTAT است.

سیگنال‌های تنظیمی و نواحی بین ژنی در SVCV بسیار حفاظت شده‌اند که از این نظر با توالی‌های بین ژنی جنس‌های Novirhabdovirus و Lyssavir متفاوت است. از سوی دیگر نواحی 5'UTR هر پنج ژن این ویروس متحدالشکل بوده و دقیقاً متشکل از ده نوکلئوتید فرادست و کدون سیگنالی ATG در نقطه شروع ترجمه بوده که از این نظر با سایر Vesiculivirها فرق دارند. این نواحی ۱۰ نوکلئوتیدی دارای یک سیگنال پنتامری شروع رونویسی می‌باشد که بسیار حفاظت شده است. چهار ژن N, M, G و L دارای یک توالی AACAGACATC در ناحیه 5'UTR بوده و ژن P تنها در یک نوکلئوتید با سایر ژن‌ها تفاوت داشته و دارای توالی AACAGAGATC می‌باشد. چنین ترادفی در سایر وزیکولو ویروس‌ها نیز وجود دارد با این تفاوت که در نوکلئوتیدهای ۷ و ۸ با SVCV فرق دارند (Ahne et al. 2002).





conserved gene junction and upstream untranslated region:



### شکل ۱-۷- آرایش ژنی و توالی‌های بین ژنی SVCV

ژن G رمز کننده ۵۰۹ اسید آمینه است. و حاوی دو منطقه آب گریز شامل منطقه سیگنال پپتید و منطقه ترانس ممبران می‌باشد. توالی این پروتئین ۳۱-۳۳٪ مشابه سایر وزیکولو ویروس‌ها و تنها ۱۹-۲۴٪ مشابه سایر رابدو ویروس‌ها می‌باشد. علاوه بر این، تفاوت‌های بیولوژیک و سرولوژیک این پروتئین منجر به پیدایش سویه‌های مختلف SVCV گردیده است. در نهایت در سال ۲۰۰۲ توالی کامل اسید نوکلئیک SVCV تعیین گردید (Hoffmann, 2002).

اولین چهارچوب باز خوانش (ORF) در حد فاصل نوکلئوتیدهای ۱۳۲۶-۵۵ واقع بوده و رمز کننده نوکلئوپروتئین SVCV می‌باشد. دومین چهارچوب باز خوانش در حد فاصل نوکلئوتیدهای ۱۴۰۷-۲۳۳۶ واقع بوده و رمز کننده فسفو پروتئین ۳۰۹ اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی ۳۵/۵ کیلو دالتون است. نقطه شروع رونویسی از نوکلئوتید ۱۳۹۷ آغاز شده و بر روی نوکلئوتید ۲۳۶۳ با سیگنال پایان رونویسی / سیگنال پلی آدنین یعنی توالی TATG(A)<sub>۷</sub> به اتمام می‌رسد. چهارچوب باز خوانش پروتئین ماتریکس (نوکلئوتیدهای ۳۰۴۷-۲۳۷۶) حاوی ۲۲۴ کدون بوده و رمز کننده پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵/۶ کیلو دالتون می‌باشد. توالی اسیدهای آمینه این پروتئین دارای ۳۳/۳٪ مشابهت با پروتئین ماتریکس ویروس‌های Rabies (RV)، ۳۱/۶٪ با Vesiculo Stomatitis Virus (VSV) و ۳۱/۲٪ با Hirame Rhabdovirus (HRV) است.

چهارچوب باز خوانش چهارم در ناحیه نوکلئوتیدهای ۳۰۹۴-۴۶۲۳ قرار داشته و رمز کننده گلیکوپروتئین G این ویروس می‌باشد. رونویسی این گلیکوپروتئین در نقطه ۳۰۸۴ آغاز شده و در نقطه ۴۶۷۱ به پایان می‌رسد. این گلیکوپروتئین حاوی ۵۰۹ اسید آمینه بوده و دارای وزن مولکولی ۵۷/۴ کیلو دالتون است.

چهارچوب باز خوانش پنجم رمز کننده یک RNA پلیمراز وابسته به RNA می‌باشد. این چهارچوب باز خوانش در حد فاصل نوکلئوتیدهای ۱۰۹۷۳-۴۶۸۶ واقع بوده و مشتمل بر ۲۰۹۵ کدون و رمز کننده پروتئینی با وزن مولکولی ۲۳۸ کیلو دالتون است. رونویسی این ORF در نقطه ۴۶۷۶ آغاز شده و در نقطه ۱۱۰۰۰ به پایان می‌رسد (جدول ۱-۱ و ۱-۲).

جدول ۱-۱- مشخصات ژن‌ها و پروتئین‌های SVCV

Gene	Total gene length (nt)	Upstream UTR (nt)	Downstream UTR (nt)	ORF (nt)	Protein (aa)	Protein (mw)	Protein (pI)
N	1335	10	68	1254	418	47000	5.57
P	967	10	27	927	309	35622	4.46
M	716	10	34	669	223	25627	8.61
G	1588	10	48	1527	509	57338	5.54
L	6325	10	(trailer)	6285	2095	238244	8.63

جدول ۲-۱. مقایسه ویژگی‌های پروتئین‌های SVCV با سایر رابدوویروس‌ها

SVCV	Identities of SVCV proteins to (%)								
	Protein	Amino acids	Molecular mass (kDa)	VSV	PV	RV	VHSV	IHNV	HRV
N	418	47.0	52.5	45.5	25.4	32.0	25.9	10.0	20.0
P	309	35.5	26.1	22.0	17.6	35.0	22.0	22.5	21.7
M	223	25.6	31.6	28.5	33.3	25.0	16.6	31.2	22.7
G	509	57.4	32.1	33.7	23.1	24.2	23.2	25.7	26.2
L	2095	238.2	53.6	n.a. <sup>b</sup>	36.2	21.7	22.3	n.a. <sup>b</sup>	23.0

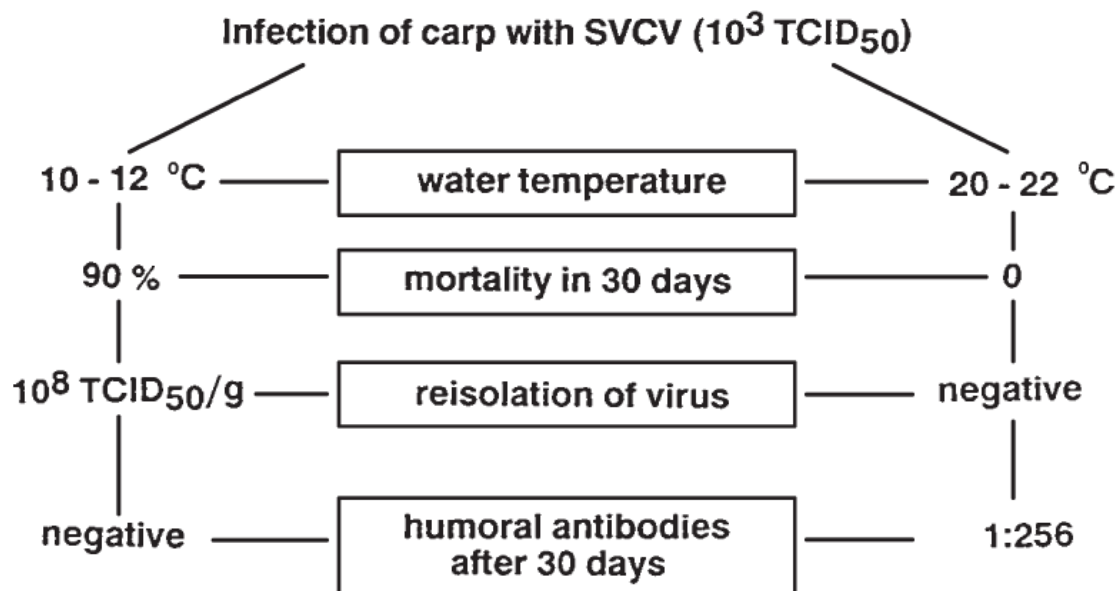
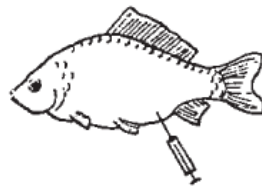
SVCV: Spring Viraemia of Carp, VSV: Vesicular Stomatitis Virus, PV: Piry Virus, RV: Rabies Virus, VHSV: Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus, IHNV: Infectious Haematopoietic Necrosis Virus, HRV: Hiram Rhabdovirus, SHRV: Snakehead Rhabdovirus.

#### ۴-۵-۱- خصوصیت آنتی ژنیک SVCV

مطالعات متعدد نشان دهنده بروز پاسخ ایمنی همورال علیه SVCV در ماهیان حساس می‌باشد. آنتی‌بادی‌های تولیدی عمدتاً علیه گلیکوپروتئین G ویروس ترشح می‌گردند (Fijan & Matasin 1980, Fijan 1988). القا و تولید این آنتی‌بادی‌ها بستگی به شرایطی همچون سن ماهی، نحوه انتقال عفونت و به ویژه دمای آب دارد. معمولاً در صورت حضور ویروس در آب با دمای ۲۰°C، در مدت هفت روز پس از آغاز عفونت شاهد افزایش ترشح آنتی‌بادی خواهیم بود در حالی که ترشح آنتی‌بادی در دمای ۱۳°C حدود هفت هفته به طول می‌انجامد (Ahne et al., 2002) (شکل ۱-۸).

بررسی‌های سرولوژیک نشان دهنده عدم شباهت آنتی‌ژنیک بین SVCV با ویروس‌های IHNV، VHSV، و سایر اعضاء جنس Novirhabdovirus می‌باشد (Hill et al., 1975). اگرچه شباهت آنتی ژنی بین SVCV و PFRV دیده شده است (Jorgensen et al. 1989). برخی از مطالعات نشان دهنده واکنش تقاطعی بین SVCV و PFRV در آزمایشات ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از آنتی سرم‌های پلی کلونال می‌باشد که این امر شاید به دلیل وجود شباهت بین پروتئین‌های G، N و M باشد. بر اساس چنین شباهت‌هایی، گاهی در برخی از مطالعات این دو

ویروس را به عنوان دو سروتیپ از یک ویروس معرفی می‌نمایند. البته نشان داده شده است که تفاوت‌های ژنی در گلیکوپروتئین G این دو ویروس وجود دارد و لذا می‌توان به کمک تکنیک‌های مولکولی این دو ویروس را از یکدیگر مجزا ساخت. SVCV جزء ویروس‌های اخطارکردنی سازمان جهانی بهداشت حیوانات می‌باشد. متأسفانه به دلیل تنوع ژنتیکی رابدو ویروس‌های ماهیان و شباهت‌های سرولوژیک به ویژه بین این ویروس با PFRV (Warg et al., 2007) که جزء ویروس‌های اخطارکردنی OIE نیست، شناسایی SVCV امری وقت‌گیر شده است.



شکل ۱-۸- تأثیر دمای آب بر عفونت SVCV در ماهی کپور معمولی و پاسخ ایمنی میزبان علیه ویروس (Wolf, 1988)

گلیکوپروتئین سطحی G با وزن مولکولی ۵۷/۴ کیلو دالتون دارای بیشترین قدرت آنتی ژنیسته بوده و به عنوان مهم‌ترین آنتی ژن SVCV عمل می‌نماید. این آنتی ژن تعیین کننده ویژگی‌های سرولوژیک این رابدو ویروس بوده (Teng et al. 2007) و عامل اتصال ویروس به سطح سلول و القاء اندوسیتوز می‌باشد. به دلیل وجود تنوع در ژن رمز کننده این گلیکوپروتئین این ناحیه ژنی جهت مطالعه و بررسی گروه‌های ژنی سویه‌های مختلف جداسازی شده SVCV مورد استفاده قرار می‌گیرد که بر این اساس سویه‌های SVCV در چهار گروه ژنی Ia، Ib، Id، Ic قرار می‌گیرند (Stone et al. 2003; Liu et al. 2004).

شناسایی الگوی تغییر اسیدهای آمینه در فهمیدن تکامل مولکولی سویه‌های مختلف SVCV و طراحی واکسن‌های موثر بسیار ضروری به نظر می‌رسد. گروه ژنی Ia از انگلستان، چین، آمریکا، کانادا و برخی از کشورهای آسیایی دیگر گزارش شده است. گروه‌های ژنی Ib و Ic از کشورهای همچون مولداوی، اوکراین، روسیه، بلاروس، گرجستان، لیتوانی، مولداوی و ... گزارش شده‌اند و گروه ژنی Id نیز از انگلستان، آلمان و اتریش گزارش شده‌اند. طبق این گزارشات به نظر می‌رسد که تا حدی اختصاصیت جغرافیایی برای هر یک از گروه‌های ژنی SVCV وجود دارد اما هنوز اطلاعات چندانی در مورد تفاوت‌های تکاملی بین این گروه‌های ژنی وجود ندارد.

### ۵-۱-۵-۵- پایداری ویروس

ویروس ویرمی بهاره کپور قادر است به مدت پنج هفته در آب با دمای  $10^{\circ}\text{C}$  پایدار و فعال بماند. همچنین نشان داده شده است که این ویروس به مدت شش هفته در رسوبات آبگیرها با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و به مدت چهار هفته در رسوبات با دمای  $10^{\circ}\text{C}$  پایدار می‌ماند (Ahne 1986). قابلیت عفونت زایی SVCV در pH حدود ۳ در مدت سه ساعت و pH حدود ۱۰ در مدت ده دقیقه از بین می‌رود. دمای بیش از  $60^{\circ}\text{C}$  در مدت نیم ساعت و همچنین مواد حل کننده لیپیدهای پوشینه ویروس همانند اتر و کلروفرم منجر به غیرفعال سازی ویروس می‌گردند. از جمله مواد ضد عفونی کننده که می‌توان جهت غیرفعال سازی این ویروس استفاده نمود شامل فرمالین ۳٪ به مدت ۵ دقیقه، هیدروکسید سدیم به مدت ۱۰ دقیقه، کلر ۵۰۰ ppm به مدت ۲۰ دقیقه، ید ۰/۰۱٪ و پتاس ۲٪ می‌باشد. علاوه بر این اشعه ماوراء بنفش با طول موج ۲۵۴nm و اشعه گاما  $10^3\text{ K Rad}$  نیز سبب غیرفعال سازی این ویروس می‌گردد (Ahne, 1982; Kiryu et al., 2007).

به منظور نگهداری ویروس، سرم جنین گاوی ۱۰-۲٪ پیش از فریز کردن به محلول حاوی ویروس افزوده می‌شود. SVCV در دماهای پایین بسیار پایدار بوده و تیترو ویروس در صورت نگهداری در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - به مدت یک ماه و یا در دمای  $30^{\circ}\text{C}$ - شش ماه دچار کاهش چندانی نمی‌گردد.

### ۶-۱-۵-۶- گونه‌های ماهیان میزبان و چرخه تکثیر ویروس در میزبان

به نظر می‌رسد آبشش‌ها مسیر اصلی ورود ویروس به پیکره میزبان می‌باشند. به دنبال ورود ویروس، ویرمی اتفاق افتاده و ویروس به سرعت خود را به اندام‌های داخلی مثل کبد، کلیه و طحال می‌رساند. پس از جای گیری ویروس در اندام‌های مختلف و تکثیر، دفع ویروس به محیط آبی از طریق ترشحات ماهی مانند ادرار، مدفوع و مخاط صورت می‌یابد.

کپورهای معمولی (*Cyprinus carpio*) میزبان‌های اصلی SVCV به شمار می‌آیند. تا کنون عفونت‌های طبیعی در گونه‌های دیگری از کپور ماهیان شامل ماهی کوی (*C. carpio koi*)، ماهی قرمز (*Carassius carassius*)، ماهی

سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) و ماهی آمور یا کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idella*) دیده شده است (Basic et al., 2009; Dixon, 2008). علاوه بر این، عفونت SVCV در دسته‌ای از ماهیان که در خانواده کپور ماهیان قرار ندارند نیز دیده شده است. از این دسته می‌توان به گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) و ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) اشاره نمود (Haghighi Khiabani Asl et al. 2008b; Koutná et al., 2003). حساسیت دسته دیگری از کپور ماهیان نسبت به عفونت SVCV طی مطالعات مواجهه سازی تجربی تأیید گردیده است. از این دسته از ماهیان می‌توان به ماهی زبرا (*Danio rerio*)، (*Rutilus rutilus*) Roach و ماه گویی (*Lebistes reticulatus*) اشاره نمود (Sanders et al., 2003).

مخازن طبیعی این ویروس شامل ماهیان بیمار و ماهیان آلوده می‌باشند. از ناقلین طبیعی می‌توان به ماهیان آلوده، انگل بی مهره کپور (*Argulus foliaceus*)، زالوهای گونه *Piscicola geometra* و همچنین پرنده‌های ماهی خوار مانند مرغ ماهی خوار اشاره نمود. علاوه بر این دیده شده است که مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) نیز قادر به نگهداری، تکثیر و انتقال SVCV می‌باشد. ضمن اینکه برخی از بندپایان آبرزی نیز می‌توانند نقش ناقل ویروس را بر عهده داشته باشند (OIE, 2012).

به طور کلی ماهیان جوان حساسیت بیشتری در مقابل عفونت SVCV از خود نشان می‌دهند، اگرچه ماهیان حساس در همه سنین ممکن است تحت تأثیر عفونت قرار گیرند. میزان حساسیت هر ماهی نسبت به عفونت با این ویروس با سایر ماهیان فرق دارد و این ویژگی علاوه بر سن تحت تأثیر عواملی همچون شرایط فیزیولوژیک و به ویژه وضعیت سیستم ایمنی ماهی می‌باشد. بیشترین تجمع ویروس اغلب در بافت‌های کبد و کلیه ماهیان آلوده گزارش شده است و ویروس با تیترا کمتری در طحال، آبشش و همچنین مغز ماهی دیده می‌شود (OIE, 2012).

### ۷-۵-۱- الگوی بیماری و چرخه عفونی

به طور کلی رابدو ویروس‌ها از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده که ناشی از برهم کنش پروتئین سطحی G با گیرنده سطح سلولی است وارد سلول هدف می‌گردند. سپس به دنبال ادغام پوشینه ویروس با غشا اندوزوم، نوکلئوکسپید ویروس در درون سیتوپلاسم آزاد می‌گردد. درون سیتوپلاسم اسیدنوکلئیک ویروس با واسطه RNA پلیمراز وابسته به RNA رونویسی شده و به این ترتیب پروتئین‌ها و ژنوم ویروسی ساخته می‌شوند. جهت ساخته شدن ویریون‌های جدید پروتئین‌های N، L و P که توسط ریبوزوم‌های آزاد ساخته می‌گردند، به RNA جدید ساخته شده ویروس اتصال می‌یابند و تشکیل یک ریبونوکلئوپروتئین می‌دهند. این مجموعه در مرحله بعد به پروتئین ماتریکس اتصال می‌یابند. پروتئین G بر روی شبکه اندوپلاسمی دانه دار ساخته می‌شود و پس از گلیکوزیله شدن و اصلاحات پس از ترجمه در شبکه اندوپلاسمی و دستگاه گلژی، به سمت غشا سلول میزبان مهاجرت کرده و با آن ادغام می‌گردد. سپس کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین-پروتئین ماتریکس به آن نواحی از

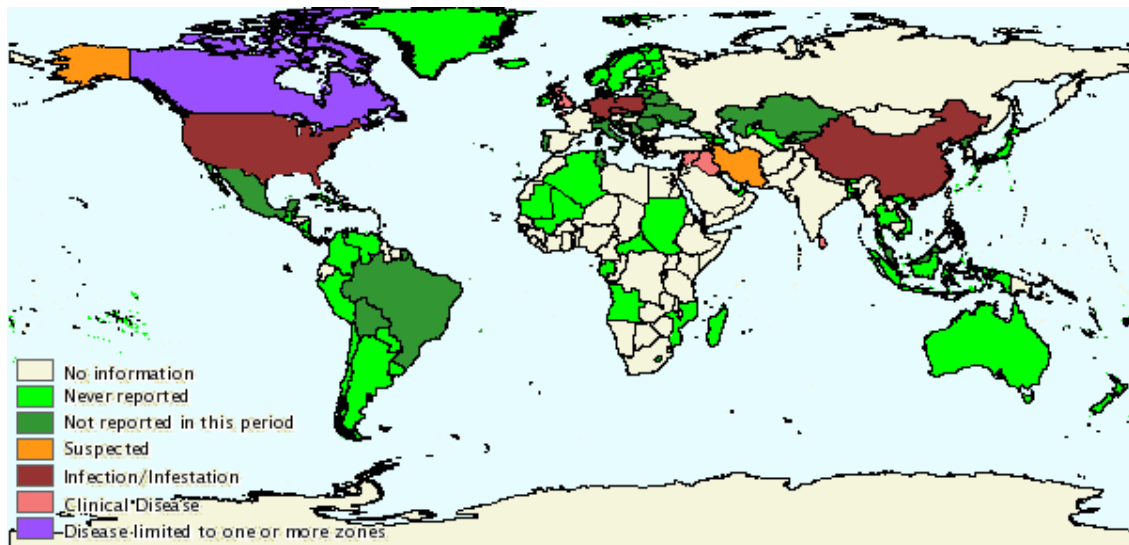
غشا که غنی از پروتئین G است حرکت کرده و به دنبال جوانه زدن از غشا، این پروتئین بر روی پوشینه ویروس قرار گرفته و ویرونی‌های کامل آزاد می‌گردند (Purcell et al. 2012).

انتقال افقی ویروس اصلی‌ترین مکانیسم سرایت SVC به شمار می‌رود. آزادسازی ویروس از طریق ترشحات ماهیان آلوده و قابلیت بقا ویروس در محیط آبی به مدت چندین هفته و تا زمان ورود به میزبان جدید عامل اصلی انتقال عفونت SVCV به شمار می‌آید. از سویی، انتقال عمودی عفونت از طریق تخم و سلول‌های جنسی تا کنون تأیید نشده است. اگرچه گزارشاتی مبنی بر جداسازی SVCV از مایعات تخمدانی ماهی وجود دارد و به این دلیل نمی‌توان نقش انتقال عمودی عفونت را کاملاً غیر محتمل دانست (OIE, 2012).

### ۸-۵-۱- توزیع جغرافیایی بیماری

از آنجا که دمای پایین آب نقش بسیار مهمی در تثبیت عفونت و بروز بیماری دارد، تا مدت‌ها اغلب موارد بروز SVC از کشورهای اروپایی که در زمستان دمای آب پایینی دارند گزارش می‌گردید. به همین دلیل بسیاری از گزارشات SVC مربوط به کشورهای اروپایی و کشورهای استقلال یافته از شوروی سابق می‌باشد. عمده‌ترین این گزارشات از کشورهایی همچون روسیه، اوکراین، بلغارستان، بلاروس، گرجستان، آلمان و انگلستان انتشار یافته است (Dixon, 2008). در سال ۱۹۹۸ نیز شیوع SVC در برزیل و در سال ۲۰۰۲ در چندین ایالت آمریکا (OIE, 2012) تأیید گردیده است. در ماه آوریل ۲۰۰۲ در یکی از بزرگترین مزارع پرورش ماهی در ایالت کارولینای شمالی کپورهای یک ساله یکی از حوضچه‌ها در اثر ابتلا به SVC شروع به تلفات نمودند (Goodwin, 2009; Goodwin et al. 2002) و به دنبال آن SVCV در چندین مزرعه دیگر در همان منطقه شناسایی گردید. در نتیجه این اپیدمی ۱۵۰۰۰ ماهی تلف شده و بیش از ۱۳۵۰۰۰ ماهی نیز معدوم گردیدند. یک ماه بعد در یکی از دریاچه‌های طبیعی ایالت ویسکونسین آمریکا بیش از ۱۵۰۰ کپور در اثر ابتلا به SVC تلف شدند (Dikkeboom et al, 2004) و سال بعد SVCV از ماهیان به ظاهر سالم در یکی از کانال‌های آب ایالت ایلینویز که به دریاچه میشیگان منتهی می‌گردد جداسازی شد. در سال ۲۰۰۴ دو بار شیوع SVC یکی در ایالت واشنگتون و دیگری در ایالت میسوری گزارش گردید (Warg et al. 2007). در ماه ژوئن ۲۰۰۶، نیز SVCV برای اولین بار در کانادا و در یکی از دریاچه‌های اونتاریو شناسایی گردید (Garver, 2007). این بار عفونت در ماهیان به ظاهر سالم که قرار بود به فرانسه صادر شوند مشاهده شد (شکل ۱-۹).

در سال ۲۰۰۴ نیز برای نخستین بار گزارشاتی مبنی بر بروز این بیماری در چین وجود داشته است (Liu et al., 2004; Teng et al., 2007). اولین مورد این بیماری در سوئیس در سال ۲۰۰۱ (Bernct and wahl) و در دانمارک در سال ۲۰۱۲ به ثبت رسیده است (OIE, 2012). در سال ۲۰۰۸، حقیقی و همکاران طی مطالعاتی که بر روی ماهیان قزل‌آلای پرورشی شمال ایران و همچنین کپورهای پرورشی داشتند، موفق به ردیابی SVCV به روش RT-PCR از ماهیان بیمار گردیدند.



شکل ۹-۱- موارد گزارش SVC در جهان از ژانویه ۲۰۰۵ تا دسامبر ۲۰۱۰

(سازمان جهانی بهداشت حیوانات، OIE)

#### ۹-۵-۱- عفونت طبیعی SVCV در ماهیان حساس

الگوی بیماری تحت تأثیر عواملی همچون دمای آب، سن و شرایط فیزیولوژیک ماهیان، تراکم جمعیتی و عوامل استرس‌زای محیطی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، ایمنی اختصاصی شامل ایمنی سلولی و همورال و ایمنی غیر اختصاصی ناشی از تولید اینترفرون‌ها نقش بسیار مهمی در روند عفونت و بروز بیماری دارند. معمولاً پاسخ ایمنی غیر اختصاصی ۲۴ ساعت پس از شروع عفونت فعال می‌گردد در حالی که فعال‌سازی آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده یک هفته به طول می‌انجامد.

شیوع بیماری معمولاً در حد فاصل دمایی  $17^{\circ}\text{C}$ – $11^{\circ}\text{C}$  رخ می‌دهد. میزان تلفات در دماهای کمتر از  $10^{\circ}\text{C}$  بسیار کم بوده و در دمای بیش از  $22^{\circ}\text{C}$  به شدت کاهش می‌یابد که این امر ناشی از فعال شدن سریع‌تر و مؤثرتر پاسخ ایمنی میزبان در دماهای بالاتر می‌باشد (Ahne et al. 2002). تلفات بهاره ماهیان حساس به طور معمول ۷۰–۴۰ درصد بوده و در ضمن علائم بیماری و میزان تلفات ممکن است تحت تأثیر عوامل عفونی و باکتریایی ثانویه نیز قرار گیرد (Fijan, 1983). شرایط و عوامل استرس‌زا همچون حمل و نقل و یا ضعف فیزیولوژیک ماهیان در پایان زمستان نیز از عوامل مستعدکننده شیوع SVC به شمار می‌آیند. از سویی، ماهیانی که قادر به مقاومت در برابر عفونت بوده و بقا می‌یابند، به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده که تا چندین ماه پایدارند، تا مدت‌ها نسبت به کسب عفونت مجدد مقاوم می‌گردند (Fijan, 1988).

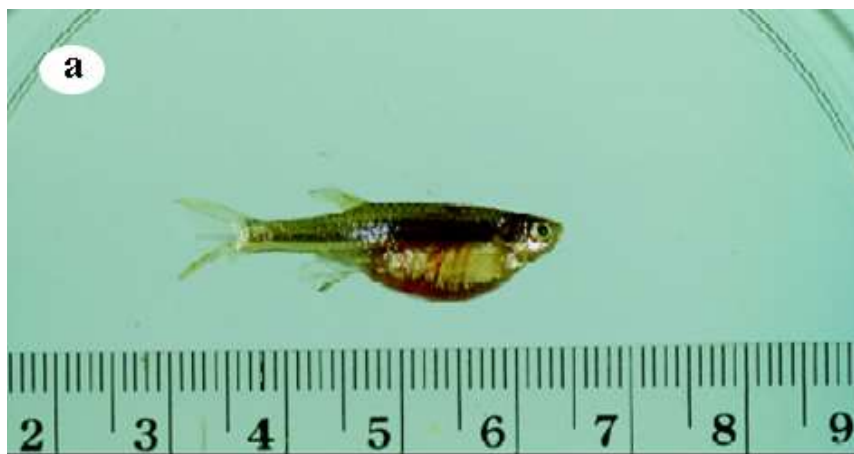
فاکتورهای اصلی ایمنی ذاتی در ماهیان شامل اینترفرون‌های تیپ ۱ ( $\text{IFN}\phi$ ) و تیپ ۲ ( $\text{IFN}\gamma$ ) می‌باشند. مطالعات محدودی بر روی عفونت‌های SVCV انجام پذیرفته است که نشان دهنده حضور این اینترفرون‌ها در سرم ماهیان آلوده است. در یک مطالعه اخیراً نشان داده شده است که اینترفرون تیپ ۲ در ماهی زبرا قادر به القاء مقاومت در

برابر عفونت SVCV در ماهیان حساس بوده و منجر به تحریک سریع اما موقت سایر فاکتورهای سیستم ایمنی می‌گردد (Purcell et al. 2012).

### ۱۰-۵-۱- علائم بیماری

ماهیان بیمار معمولاً طیف متنوعی از علائم بالینی و رفتاری را از خود نشان می‌دهند. این ماهیان اغلب تمایل دارند که در اطراف محل ورودی آب تجمع یابند. در ضمن قدرت عکس‌العمل آنان نسبت به عوامل محرک محیطی و سرعت شنای آنان به شدت کاهش می‌یابد. در مراحل پیشرفته‌تر بیماری، علائمی همچون کج شدن، عدم تعادل و وارونگی از خود نشان می‌دهند که از علائم پایانی حیات این ماهیان به شمار می‌رود. از علائم بالینی بیماری می‌توان به تیرگی پوست، تورم شکمی، اگزوفتالمی (بیرون زدگی چشم‌ها)، خونریزی‌های زیرپوستی به ویژه در ناحیه شکمی و سینه‌ای، خونریزی آبشش و چشم‌ها، رنگ پریدگی آبشش‌ها، التهاب و تورم عروق اشاره نمود (Ahne et al., 2002) (شکل ۱-۱۰). البته لازم به ذکر است که همه علائم در ماهیان بیمار دیده نمی‌شود و برخی از علائم نیز ممکن است تحت اثر پاتوژن‌های ثانویه ایجاد گردند. همچنین در برخی از موارد بروز تلفات ناگهانی بدون بروز علائم بالینی گزارش شده است (OIE, 2012).

خونریزی اندام‌های داخلی مثل کیسه شنا، کبد و ... نیز ممکن است در ماهیان بیمار دیده شود. تغییرات بافتی متعددی در ماهیان بیمار دیده می‌شود، عمده‌ترین این تغییرات شامل تغییرات عروق خونی کبد، مهاجرت لمفوسیت‌ها و ملانوماکروفاژها به اندام‌ها، تخریب و تورم دیواره عروق خونی، نکروز و واکوئلاسیون پارانشیم کبد، پرخونی و تجمع گلبول‌های قرمز در اندام‌ها، آتروفی اپی‌تلیوم روده، جمع شدگی و چسبندگی تیغه‌های ثانویه آبشش‌ها می‌باشد (Ahne et al. 2002).



(a) خونریزی‌های شکمی در ماهی زبرا





(b) خونریزی وسیع و علائم بالینی در ماهی کپور



(c) علائم بالینی داخلی ناشی از ویرمی بهاره کپور. ادم و خونریزی عضله قابل مشاهده است.



(d) خونریزی در کیسه شنا ناشی از ویرمی بهاره کپور



(e) بیرون زدگی چشم‌ها و خونریزی‌های جلدی در ماهی کپور معمولی

شکل ۱-۱۰-۱- علائم بالینی ناشی از ویروسی بهاره کپور  
(تصاویر برگرفته از Sanderse *et al.*, 2003 و Goodwin, 2009)

#### ۱۱-۵-۱- عفونت زایی تجربی یا مطالعه بیماری‌زایی

انجام آزمایش عفونت‌زایی تجربی در ماهیان سالم، از مهم‌ترین روش‌های رفتار سنجی عوامل بیماری‌زا در ماهیان میزبان می‌باشد. در این روش‌ها عامل بیماری‌زا اجازه تماس با ماهیان سالم را در محیطی عاری از هرگونه عامل بیماری‌زای دیگر می‌یابد. در روش حمام آبی اجازه تماس مستقیم ماهی با ویروس و جذب آن از طریق جلدی، آبششی و گوارشی وجود داشته و ویروس پس از ورود به بدن میزبان سیر طبیعی عفونت را در پیش می‌گیرد در حالی که در روش تزریق درون صفاقی، ویروس مستقیماً به بافت‌های هدف ماهی تزریق می‌گردد. مطالعات عفونت‌زایی تجربی SVCV در ماهی کپور بالغ به روش حمام آبی با دمای  $13^{\circ}\text{C}$  نشان داده است که ویروس در مراحل اولیه از آبشش‌ها قابل جداسازی است بنابراین این اندام کانون اولیه عفونت به شمار می‌رود. به دنبال بروز یک دوره محاق چهار روزه، ویروس از طریق جریان خون به اندام‌های داخلی می‌رسد. ۱۱ روز پس از شروع عفونت، ویروس از مدفوع و مخاط ماهیان قابل جداسازی است و اولین تلفات ۲۰ روز پس از عفونت قابل انتظار می‌باشد. اولین علائم مثل خونریزی اندام‌ها و پریتونیت ۸ تا ۱۱ روز پس از آلودگی رخ می‌دهد. ویروس بیش از ۱۰ هفته می‌تواند در ماهیان بقاء یافته دوام داشته باشد و این ماهیان نقش حامل ویروس را ایفا می‌نمایند (Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2012).

#### ۱۲-۵-۱- پایش و پیشگیری SVC

به دلیل ماهیت بسیار عفونی SVCV هرگونه شناسایی این ویروس در یک مکان جغرافیایی جدید بلافاصله و در مدت ۴۸ ساعت باید به سازمان جهانی بهداشت حیوانات گزارش شود. روش‌های کنترل بیماری SVC متکی بر

پیشگیری بر خورد ماهیان حساس با ویروس و بهبود شرایط بهداشتی پرورش ماهی می‌باشد. کاهش تراکم ماهیان پرورشی در زمستان و اوایل بهار سبب کاهش سرعت انتشار بیماری خواهد شد. همچنین افزایش دمای آب به بیش از  $19-20^{\circ}\text{C}$  سبب توقف و یا کاهش گسترش SVC می‌گردد. به همین دلیل است که شیوع SVC در مناطق استوایی چندان گزارش نشده است. در مزارع بزرگ ارتباط و حرکت ماهیان ناقل و بیمار باید کنترل گردد. از سویی انتخاب و تلاقی سویه‌های ماهی مقاوم به SVCV چندان رضایت بخش نبوده است.

گزارش شده است که واکسیناسیون با سویه اروپایی کشته شده SVCV تا حدی منجر به ایمنی محدود می‌گردد (Tesarsik & Macura 1981) اما به دلیل خطر عدم غیرفعال سازی کامل، چنین واکسن‌هایی تاکنون چندان مورد توجه قرار نگرفته‌اند. اگرچه برخی از محققین تاکنون کارایی DNA واکسن‌ها را علیه عفونت SVCV با استفاده از مطالعات عفونت زایی تجربی مورد بررسی قرار داده‌اند (Dixon, 2008; Emmenegger & Kurath, 2008) اما هنوز هیچ واکسن و یا داروی موثری به صورت تجاری جهت مقابله با SVCV معرفی نشده است و تمامی فعالیت‌های پیشگیرانه و کنترلی متکی بر شناسایی و جداسازی ماهیان آلوده است.

کارایی DNA واکسن‌های تجربی ساخته شده از ژن پروتئین G در رابدو ویروس‌های IHNV، VHSV، HIRRV و SVCV تا حدی در گونه‌های میزبانی مختلف نشان داده شده است. اگرچه این پروتئین آنتی ژن مناسبی جهت تحریک سیستم ایمنی ماهیان به شمار می‌رود اما این شرایط زمانی محقق می‌گردد که این پروتئین از گلیکوزیلاسیون، تاخوردگی‌ها و شرایط فضائی مناسبی برخوردار باشد. از آنجا که تولید وسیع و به شکل تجاری پروتئین G با گلیکوزیلاسیون و تاخوردگی مناسب مشکل است، استفاده از آن به عنوان یک واکسن اجزائی کارآمد را محدود ساخته است (Lorenzen and olesen, 1997; Winton, 1997). اگرچه اخیراً نشانه‌هایی از موفقیت این واکسن‌ها با به کارگیری حشرات جهت تولید چنین واکسن‌هایی نشان داده شده است.

یکی دیگر از مشکلات واکسیناسیون علیه این ویروس نیازمندی به واکسیناسیون انفرادی است که به این ترتیب امکان واکسیناسیون همزمان تعداد وسیعی از ماهیان سلب می‌گردد. به همین جهت نیاز به طراحی واکسن‌هایی جدید که از طریق گوارشی و یا آبششی کارایی داشته باشند احساس می‌گردد.

در حال حاضر یک واکسن کارا و امن علیه SVCV در دسترس نمی‌باشد. اگرچه کارایی برخی از واکسن‌های غیر فعال و یا زنده تخفیف حدت یافته امید بخش بوده است. واکسیناسیون دهانی یا درون صفاقی با ویروس زنده تخفیف شدت یافته در فصل پاییز، سبب افزایش مقاومت به بیماری به مدت چند ماه خصوصاً در طول زمستان گردیده است (Ahne et al., 2002). در اروپای شرقی واکسن کشته به دنبال تزریق درون صفاقی نتایج موفقیت آمیزی در پی داشته است. همچنین کاربرد DNA واکسن‌ها علیه SVCV اخیراً مورد بررسی قرار گرفته شده است (OIE, 2012). نکته مهم در واکسیناسیون، به کارگیری واکسن در دمای بالای  $20^{\circ}\text{C}$  به منظور فعالسازی سیستم ایمنی ماهی است. در زمینه درمان دارویی کارایی داروی Metisoprinol به صورت in-vitro علیه SVCV

نشان داده شده است که تزریق RNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای می‌تواند از طریق القاء اینترفرون تا ۳ هفته محافظت کننده باشد اگرچه این واکسیناسیون از طریق حمام آبی کارایی چندانی ندارد (Purcell et al., 2012). شیوع SVC نشان دهنده نیاز به تمرکز بر روی توسعه کیت های تشخیصی و واکسیناسیون می‌باشد. شناسایی و تعیین ویژگی های ژنومی، اپیدمیولوژی و روابط تکاملی سویه های این ویروس جهت توسعه و دست یابی به واکسن های موثر ضروری می‌باشد.

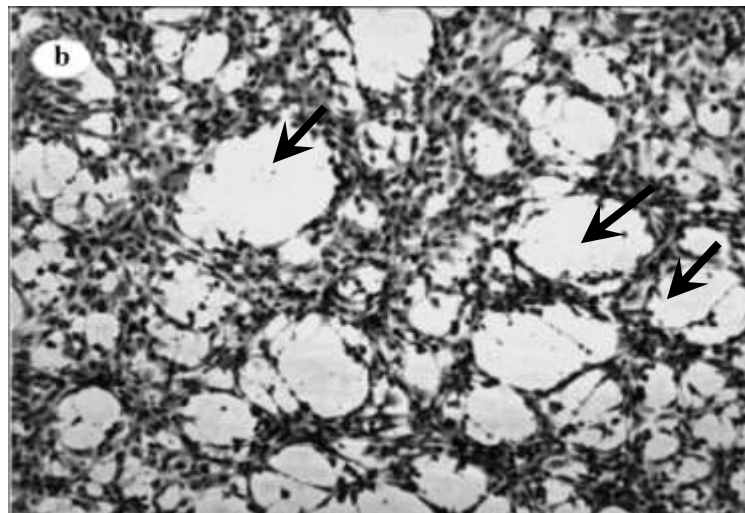
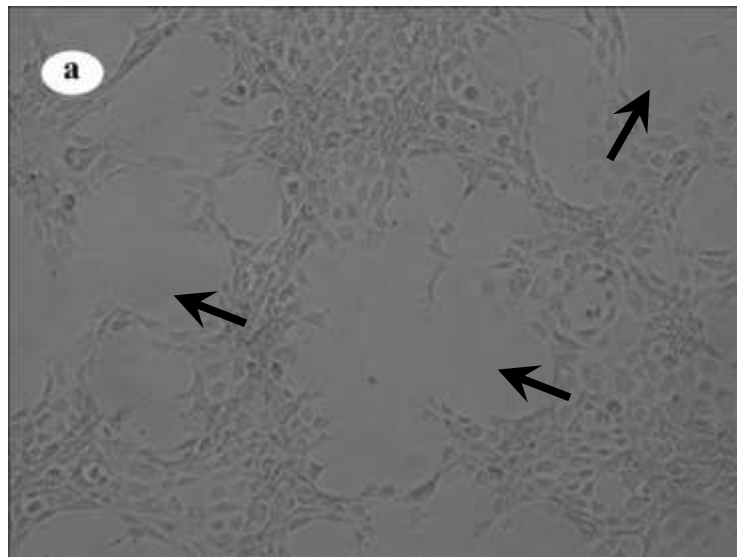
دیده شده که یکی از مشتقات صناعی پورین ها، ایزو پورین ها (Inosiplex<sup>®</sup>, Imunovir<sup>®</sup>, methisopreinol<sup>®</sup>) با مهار همانند سازی SVCV از طریق مهار سنتز RNA ویروس و تنظیم سیستم ایمنی می‌تواند در شرایط in-vitro گزارش از اثرات موثر اینترفرون ها علیه SVCV در شرایط in-vitro وجود دارد. به عنوان مثال Wang و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که اینترفرون نو ترکیب خالص شده در باکتری *E. coli* خصوصیت ضد ویروسی مناسبی علیه SVCV دارد.

### ۱۳-۵-۱- تکثیر SVCV در شرایط آزمایشگاهی

تا کنون موفق شده‌اند ویروس ویرمی بهاره کپور را در رده های سلولی مختلف با منشاء ماهی، پرندگان و پستانداران تکثیر نمایند که این تکثیر ها در محدوده دمایی ۳۱-۴<sup>o</sup>C صورت پذیرفته است (Ahne et al., 2002) البته دمای بهینه تکثیر in-vitro این ویروس ۲۵-۲۰<sup>o</sup>C می‌باشد. آثار سیتوپاتیک ناشی از تکثیر این ویروس بر حسب دما و تیره سلولی مورد استفاده متفاوت است. بهترین سیستم تکثیر SVCV، تیره های سلولی مشتق شده از کپور ماهیان شامل تیره EPC (Epithelioma papillosum cyprini) (Fijan et al. 1983)، تیره FHM (Fathead minnow) (Ahne et al., 2002) و Carp leucocyte culture (Faisal & Ahne 1990) می‌باشد. با استفاده از چنین تیره های سلولی، تیترو ویروسی تا بیش از ۵.۰ x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> قابل دست یابی است. تکثیر SVCV بر روی سلول های حساس ۷۲ ساعت پس از شروع عفونت منجر به تشکیل پلاک های کامل می‌گردد. تیره سلولی EPC اولین بار از سلول های تکثیر شونده زخم های پوستی کپور معمولی *C. carpio* به دست آمد و پس از مدتی این رده سلولی تبدیل به یکی از پر کاربردترین ابزارهای تحقیقاتی بر روی ویروس های ماهیان گردید. به دلیل حساسیت وسیع این تیره سلولی نسبت به طیف فراوانی از ویروس های ماهیان، تیره سلولی EPC جهت بررسی های غربالگری وجود یا عدم وجود بیماری های ویروسی آبیان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به دلیل عدم وجود فرم تجاری این تیره سلولی، تا سال ها این سلول ها آزمایشگاه به آزمایشگاه در سراسر دنیا پراکنده شدند.

مطالعه بر روی تیره سلولی FHM نشان داده است که در مدت ۶-۴ ساعت اول، ورود ویروس به سلول ها اتفاق می‌افتد و در مدت ۱۰ تا ۲۲ ساعت ویروس به بالاترین تیترو خود می‌رسد. در دمای ۲۰<sup>o</sup>C یک سیکل کامل رشد ۱۰-۸ ساعت به طول می‌انجامد. علاوه بر این نشان داده شده است که SVCV در فیرو بلاست جوجه، سلول های

با منشاء پستانداران همچون BHK-21 (هامستر)، کلیه جنین گاو، سلول‌های با منشاء انسانی Hep-2، MDCK (سگ سانان)، SK (خوک)، Vero (میمون) و در محدوده دمایی  $22^{\circ}\text{C}$  -  $20^{\circ}\text{C}$  قابل تکثیر می‌باشد (Ahne et al., 2002). همچنین دیده شده است که SVCV قادر به القاء آپوآپتازیس در EPC می‌باشد. تغییرات شکلی همانند تغییر حجم سلول و ایجاد زوائد سلولی ناشی از تغییرات اسکلت سلولی، ۳۶ ساعت پس از عفونت رخ می‌دهد و حدود ۴۰ ساعت پس از شروع عفونت بیش از ۷۰٪ سلول‌های آلوده دچار آپوآپتازیس می‌گردند (Ahne et al., 2002). (شکل ۱-۱۱).



شکل ۱-۱۱- آثار آسیب سلولی ناشی از تکثیر SVCV در محیط کشت سلولی (a) سلولهای تیره EPC (b) سلولهای تیره FHM (تصویر بر گرفته از Ahne et al., 2002)

## ۱۴-۵-۱- روش‌های تشخیص SVCV

شناسایی بیماری‌های ویروسی ماهیان و از جمله SVC تا سال‌ها متکی بر جداسازی ویروس عامل بیماری با استفاده از کشت‌های سلولی و شناسایی بعدی آنان با استفاده از تست‌های خنثی‌سازی با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بوده است (Way, 1991; Rodak et al., 1993) که روندی بسیار وقت‌گیر و سخت بود. اخیراً روش‌های سرولوژیک همچون الایزا جهت ردیابی و شناسایی SVCV مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر روش‌های مولکولی جهت شناسایی SVCV در حال گسترش می‌باشد به ویژه روش‌هایی همچون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و همچنین واکنش‌های هیبریداسیون با استفاده از پروب‌های اختصاصی که بسیار حساس بوده و نیاز به زمان کوتاهی دارند.

روش RT-PCR و به دنبال آن واکنش هیبریداسیون با استفاده از ردیاب‌های DNA غیر رادیواکتیو جهت شناسایی SVCV مورد استفاده قرار گرفته است. در چنین مطالعاتی از ردیاب‌هایی از جنس DNA متصل به بیوتین جهت شناسایی محصول RT-PCR نمونه‌های مشکوک به آلودگی با SVCV استفاده نموده و نشان داده شد که استفاده از چنین روش‌هایی بسیار ارزان و سریع بوده و می‌تواند جهت آزمایشات غربالگری و تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد (Ahne et al. 2002).

در بین روش‌های تشخیصی روش semi-nested RT-PCR حساس‌ترین روش به شمار رفته و قادر به شناسایی ویروس در تیتراژ بسیار پایین می‌باشد (Kim, 2012). بر اساس توصیه سازمان جهانی بهداشت حیوانات انجام این آزمایش و به دنبال آن توالی‌یابی محصول RT-PCR می‌تواند جهت تایید نهایی شناسایی SVCV به کار گرفته شود. این روش جهت شناسایی و تکثیر ژن رمز کننده گلیکوپروتئین SVCV مورد استفاده قرار می‌گیرد و طی آن در مرحله اول یک محصول ۷۱۴ جفت بازی از روی الگوی ژنی گلیکوپروتئین تولید شده و این محصول مجدداً به عنوان الگو جهت تولید محصول ۶۰۶ جفت بازی به کار گرفته می‌شود (OIE, 2012).

روش‌های بسیاری جهت شناسایی و تشخیص SVCV به کار گرفته شده‌اند از جمله جداسازی به کمک کشت سلولی و مشاهده ویرون ویروسی به کمک میکروسکوپ الکترونی، آزمایشات ایمونوفلورسانس (IFA) (شکل ۱-۱۲)، الایزا، ایمونوهیستوشیمی و آزمایشات مولکولی. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نیز ابزار کارآمدی جهت توسعه روش‌های تشخیصی موثر ویروس‌های ماهیان به شمار می‌آیند که کارایی آنان جهت شناسایی Infectious Viral Haemorrhagic و Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV)، Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) و Spicemia Virus (VHSV) نشان داده شده است. اخیراً کارایی این آنتی‌بادی‌ها در تست‌هایی تشخیصی همچون الایزا جهت شناسایی SVCV نشان داده شده است اگرچه هنوز مشکلاتی در مورد اختصاصیت این آنتی‌بادی‌های علیه SVCV وجود دارد که باید مرتفع گردد (Ahne et al. 2002; OIE, 2012).

تشخیص احتمالی بر پایه وجود آنتریت، پریتونیت، ادم، خونریزی کیسه شنا، عضلات و سایر اندام‌ها استوار می‌باشد. البته عدم وجود همه این علائم دلیلی بر رد احتمال این بیماری نمی‌باشد. SVCV در لیست ویروس‌های

اخطارکردنی قرار داشته و روند تشخیصی و شناسایی آن طبق راهنمای تشخیص سازمان جهانی بهداشت حیوانات صورت می‌پذیرد (OIE, 2012). تشخیص اولیه در ماهیان بیمار مبتنی بر صحنه‌گذاری حضور ویروس در نمونه‌های بافتی می‌باشد که با استفاده از تکنیک‌هایی همچون مشاهده مستقیم ویروس با میکروسکوپ الکترونی، روش‌های ایمونوفلورسانس و الیزا روی بافت صورت می‌گیرد (Ahne et al., 2002; OIE, 2012). از سایر روش‌های تشخیصی جداسازی ویروس از ماهیان می‌باشد که در این مورد رده‌های سلولی FHM و EPC توسط سازمان جهانی بهداشت حیوانات توصیه می‌گردد. پس از جداسازی ویروس، ماهیت آن باید توسط روش‌های تأییدی همچون ایمونوفلورسانس، الیزا، خنثی‌سازی یا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تأیید گردد. به دلیل عدم اطلاعات کافی در مورد ماهیت پاسخ ایمنی میزبان در برابر SVCV و امکان بروز پاسخ‌های تقاطعی با سایر رابدو ویروس‌ها به خصوص ویروس PFR (Pik fry rhabdovirus) شناسایی آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه ویروس به عنوان تست تشخیصی هنوز قابل قبول نمی‌باشد.

#### الف. پاتولوژی ماکروسکوپی (Gross pathology) و میکروسکوپی (Histopathology)

اگرچه بروز آسیب‌های پاتولوژیک به تنهایی ابراز تشخیص مناسبی نیست اما در هدایت محققین به سوی تشخیص نهایی بسیار کمک کننده خواهند بود. آسیب‌های ماکروسکوپی در تلفات ناگهانی معمولاً دیده نمی‌شود اما اغلب آسیب‌ها شامل تجمع مایعات در حفره شکمی به همراه خون، تخریب تیغه‌های آبششی، التهاب روده، ادم و خونریزی زیر پوستی و خونریزی کیسه شنا می‌باشد. تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از SVC تقریباً در همه اندام‌ها قابل رویت می‌باشد. در کبد، عروق خونی درجاتی از ادم و التهاب و نکروز از خود نشان می‌دهند. پارانشیم کبد دچار پرخونی شده و در چندین ناحیه دچار نکروز و تخریب می‌گردد. پری‌کاردیت و تخریب و نکروز پیش رونده در قلب دیده می‌شود. طحال دچار پرخونی گردیده و جمعیت ملانوماکروفاژها افزایش می‌یابد. کلیه دچار تخریب در بافت‌های ترشحي و دفعی می‌گردد. توبول‌های کلیه مسدود شده و سلول‌ها دچار تخریب و واکوئلاسیون می‌گردند ضمن اینکه شاهد گلو مرونفریت خواهیم بود. در دوره حاد بیماری التهاب عروق و تغییر شکل سلول‌های اپی‌تلیوم و مژک‌های روده‌ای دیده می‌شود. دیواره‌های اپی‌تلیومی کیسه شنا از حالت یک لایه‌ای تبدیل به چند لایه پوسته پوسته شده و نفوذپذیری عروق آن دچار تغییر می‌گردد (Ahne et al. 2002; Sanderse et al. 2003).

#### ب. روش‌های شناسایی مستقیم

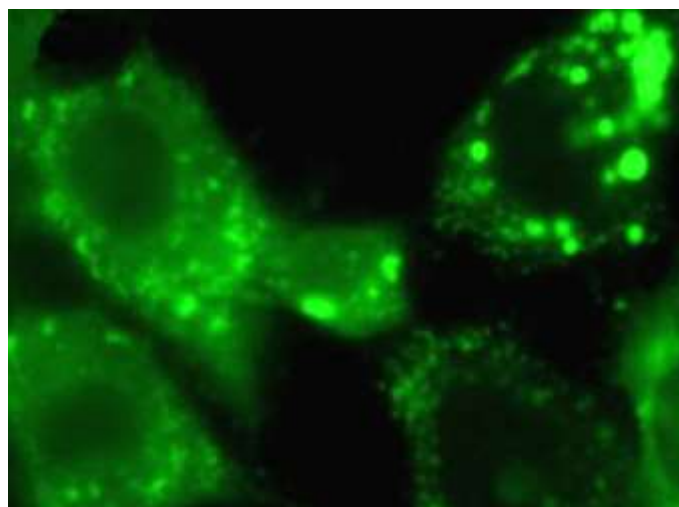
مشاهده مستقیم ویروس فشنگی شکل به کمک میکروسکوپ الکترونی تنها نشانگر وجود عفونت رابدو ویروسی در ماهی بوده و جهت تشخیص ماهیت آن تست‌های تکمیلی مورد نیاز می‌باشد. در چنین مواردی، شناسایی مستقیم آنتی ژن ویروسی به کمک تست‌های سرولوژی و یا شناسایی ویروس موجود در بافت بسیار

کمک کننده خواهد بود. البته شناسایی آنتی ژن‌ها یا اسیدنوکلئیک ویروس در بافت ماهیان ناقل مشکل بوده و روند شناسایی نیازمند جداسازی ویروس به کمک کشت سلولی است.

### ج. جداسازی و شناسایی ویروس

به دنبال جداسازی، ویروس باید به کمک تست‌های شناسایی آنتی ژن یا اسیدنوکلئیک شناسایی گردد. البته تست‌های شناسایی آنتی ژن‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال و یا پلی کلونال باید صحت گذاری شوند زیرا امکان بروز واکنش‌های تقاطعی با سایر را بدو ویروس‌ها به خصوص PFRV وجود دارد. ضمن اینکه استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال ممکن است جهت شناسایی همه زیر گروه های SVCV کارایی لازم را نداشته باشند (OIE., 2012).

همان طوری که ذکر گردید جهت جداسازی ویروس، تیره‌های سلولی EPC و FHM پیشنهاد می‌گردند. پس از تلقیح هوموژن‌های بافتی به کشت سلولی به طور روزانه و به مدت هفت روز جهت بررسی آثار آسیب سلولی، سلول‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند. در طول دوران انکوباسیون pH محیط کشت در محدوده ۷/۳-۷/۶ نگه داری می‌گردد. این کار با افزودن بافر بی کربنات استریل یا بافر HEPES (۲) - هیدروکسی اتیل پیرازین ۲- اتان سولفونیک اسید) یا بافر تریس ۲ مولار (هیدروکسی متیل آمینو متان/ کلریدریک اسید) حاصل می‌گردد. در صورت عدم بروز آثار آسیب سلولی، محتویات فلاسک کشت باید یکبار دیگر مورد کشت ثانویه قرار گرفته و به مدت ۷ روز دیگر بررسی گردند. به دنبال بروز آسیب سلولی، فلاسک‌های کشت باید فوراً جهت تست‌های تأییدی مورد استفاده قرار گیرند. تایید ماهیت ویروس جداسازی شده به کمک تست‌هایی همچون خنثی سازی ویروس (NT)، آنتی بادی درخشان غیرمستقیم (IFAT)، الایزا و تست‌های مولکولی انجام پذیر است. لازم به ذکر است که روش‌های پیشنهادی جهت تایید یا رد وجود آلودگی SVCV در نمونه‌های جمعیتی مشکوک روش کشت سلولی می‌باشد (OIE, 2012).



شکل ۱-۱۲-۱- شناسایی SVCV در سلولهای تیره EPC به روش IFAT (تصویر برگرفته از Chen et al., 2008)



**د. مقایسه روش‌های تشخیصی**

روش‌های رایج پایش و شناسایی SVCV که هم اکنون در دسترس می‌باشند در جدول ۱-۳ نشان داده شده است (OIE, 2012). همان‌طور که مشاهده می‌گردد اهمیت تست‌های تشخیصی بر حسب شرایط، در دسترس بودن، حساسیت و اختصاصیت متفاوت می‌باشند.

**جدول ۱-۳- روش‌های مورد استفاده جهت پایش و تشخیص SVCV**

Method	Targeted surveillance		Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	b	d
Histopathology	d	d	b	c
Transmission EM	d	d	d	d
Isolation in cell culture	a	a	a	a
Test for virus antigen	d	d	a	c
Test for fish antibody against the virus	c	c	c	d
RT-PCR	c	c	a	a
Sequence	na	na	a	a

a: روش پیشنهادی بر اساس دسترسی آزمایش، حساسیت و اختصاصیت

b: روش استاندارد با حساسیت و اختصاصیت مناسب

c: این روش در برخی شرایط به کار گرفته می‌شود اما به دلایل دقت، هزینه و سایر عوامل استفاده از آن با محدودیت روبروست.

d: این روش پیشنهاد نمی‌گردد.

na: روش غیر کاربردی

نکته: جداسازی ویروس از طریق کشت سلولی تنها به عنوان روش تشخیصی احتمالی مد نظر قرار گرفته و جهت تأیید نیازمند سایر روش‌های تشخیصی می‌باشد. علاوه بر این، روش‌های RT-PCR و توالی‌یابی ژنی به عنوان آزمایشات تکمیلی پیشنهاد می‌گردد (OIE, 2012).

**۶-۱- بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی (Koi herpes viral disease)**

بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی ناشی از یک ویروس DNA دار از خانواده هرپس ویریده است. میزبان‌های حساس به این بیماری، ماهی کوی و خانواده کپور ماهیان بویژه کپور معمولی هستند (Hederick و همکاران، ۲۰۰۰، OATA، ۲۰۰۱). این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ گزارش شد و در سال ۱۹۹۹ تأیید گردید. (Wolf، ۱۹۹۸؛ Fijan و همکاران، ۱۹۹۹). پس از آن بیماری از سایر نقاط جهان در آمریکا، اروپا و آسیا گزارش شد (Hederick و همکاران، ۲۰۰۰؛ Anonymous و همکاران، ۲۰۰۳؛ Waltzek و همکاران، ۲۰۰۴؛ Pokorova و

همکاران، ۲۰۰۷) بیماری را از همین گونه ها در جمهوری چک گزارش کردند. این بیماری تا کنون از ایران گزارش نشده است.

#### ۷-۱- بیماری رئو ویروسی ماهی آمور (GCRV)

رئو ویروس ماهی آمور (GCRV) یک عامل بیماری زای مهم تحت عنوان بیماری خونریزی دهنده ماهی آمور است (Chen و Jiang، ۱۹۸۳) که علاوه بر ماهی علفخوار، *Cetenopharyngodon idellus*، توانایی ایجاد بیماری در گونه های دیگر مانند کپور سیاه، *Mylopharyngodon piceus* را دارد (Ding و همکاران، ۱۹۹۱). تا کنون گونه های زیادی رئو ویروس از موجودات آبزی جداسازی و گزارش شده اند (Plumb و همکاران، ۱۹۷۹؛ Ahne و Kolble، ۱۹۸۷؛ Winton و همکاران، ۱۹۸۷؛ Varner و Lewis، ۱۹۹۱؛ Neukrich و همکاران، ۱۹۹۹). Lupiani و همکاران، ۱۹۹۷، توالی ژنوم رئو ویروس های کوهوسالمون و باس راه راه را بدست آوردند. همچنین Fang و همکاران در سال ۲۰۰۰ توالی ۳ ژن مهم را در رئو ویروس ماهی آمور گزارش نمود.

Zhang و همکاران، (۲۰۰۰) این بیماری را به عنوان عامل اصلی تلفات و ایجاد خسارات اقتصادی در مزارع گرمابی کشور چین اعلام کردند.

## ۲- مواد و روش کار

### ۱-۲- مواد مصرفی

#### آزمایش آسیب‌شناسی بافتی

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

#### کشت سلول

تیره‌های سلولی EPC و BF2، فلاسک کشت سلول ۲۵ cm<sup>2</sup> و ۷۵ cm<sup>2</sup>، محیط کشت EMEM (Eagl's Minimum Essential Medium) (ساخت شرکت سیگما)، سرم جنین گاوی (Bovine Calf Serum) (ساخت شرکت Gibco)، شرکت Sigma)، پنی‌سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰۰ μg/mL) (ساخت شرکت Gibco)، آمفوتریسین B، آب مقطر دیونیزه، تریپسین - ورسین (ساخت شرکت سیگما و مرک)، پیت استریل یکبار مصرف، پلیت ۲۴ خانه، میکروپلیت ۹۶ خانه رقت‌سازی، پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی، فیلتر ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرون، میکروپلیت ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتری استریل، سرسمپلر و میکروتیوپ در اندازه‌های مختلف، آب دیونیزه، بیکربنات سدیم (ساخت شرکت مرک)، PBS، فنل رد.

#### آزمایش آنتی‌بادی درخشان به روش غیرمستقیم (IFAT)

آنتی‌بادی مونوکلنال ضد SVCV (تهیه شده در آزمایشگاه رفرنس ویروس‌شناسی اتحادیه اروپا)، آنتی‌آنتی‌بادی بادی تهیه شده در بز و کونژوگه شده با FITC، استون، گلیسرول و (PBS-Tween80)PBST.

#### آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR و RT-PCR)

کیت استخراج RNA ستونی (ساخت شرکت کیاژن، آلمان)، کیت استخراج DNA ستونی (ساخت شرکت کیاژن، آلمان)، کیت One step RT-PCR (ساخت شرکت کیاژن، آلمان)، آنزیم Taq DNA پلیمرز (ساخت شرکت اینویترورژن)، بافر ۱۰ x و ۵ x PCR، آگارز، تریس، اسید استیک، کیت تجاری تشخیص SVC و KHV (ساخت شرکت IQ2000، تایوان) سرسمپلرهای زرد، آبی و کریستالی، میکروتیوپ‌های ۰/۲ و ۱/۵ سی‌سی، ایزوپروپانل، کلروفورم، اتانل ۹۵ درجه، اتیدیوم بروماید و دستکش یکبار مصرف

#### میکروسکوپ الکترونی

گلو تار آلدهید، سدیم کاکودیلات، اسمیوم تتراکساید، میکروتیوپ ۲ سی‌سی

## ۲-۲- لوازم غیر مصرفی

### نمونه برداری

ماشک (تور پرتابی)، وان فایبر گلاس، کپسول اکسیژن، آکواریوم، مولتی متر، سینی و لوازم تشریح، ظروف نمونه برداری در اندازه های مختلف، ماژیک ضد آب، ترازوی دیجیتال، هاون چینی.

### آزمایش آسیب شناسی بافتی

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

## کشت سلول

انکوباتور یخچالدار، میکروسکوپ اینورت (نیکون، ژاپن)، فیلتر میلی پور (شرکت میلی پور آمریکا و ساخت شرکت CHM Lab)، پیپتور (پندورف، آلمان)، هود لامینار (ژال تجهیز، ایران)، سمپلردر اندازه های ۰/۵ تا ۱۰، ۱۰ تا ۱۰۰ و ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر (پندورف، آلمان)، سمپلر ۱۲ کاناله، pH متر رو میزی، همزن مگنتیک، سانتریفیوژ یخچالدار (پندورف، آلمان)، یخچال ۴ درجه، فریزر ۲۰- درجه، فریزر ۸۰- درجه، اتوکلاو، فور، بن ماری پیپتور شارژی.

## آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم

میکروسکوپ فلورسنت، انکوباتور، سمپلردر اندازه های ۰/۵ تا ۱۰، ۱۰ تا ۱۰۰ و ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، سمپلر ۱۲ کاناله

## آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

دستگاه ترمال سایکلر BIOER (ساخت چین)، Vortex، Microcentrifuge، سانتریفیوژ یخچالدار، الکتروفورز افقی، پاور ساپلای، دستگاه عکسبرداری از ژل، وورتکس، هات بلاک.

## میکروسکوپ الکترونی

میکروسکوپ الکترونی، اولترامیکروتوم

## ۲-۳- روش کار

### ۱-۲-۳- نمونه برداری و بررسی علائم بالینی ماهیان

در بهار و تابستان سالهای ۹۱-۱۳۹۰، نمونه برداری از ۴۱۱ قطعه ماهی فیتوفاگ و امور پرواری دارای علائم بالینی از ۸۳ مزرعه دارای تلفات شدید در سطح استان گیلان صورت گرفت. ماهیان با محدوده وزنی ۵ تا ۲۳۰۰

گرم به وسیله ماشک صید شده و به صورت زنده با وان دارای کپسول اکسیژن به بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی کشور- بندرانزلی وابسته به موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور منتقل گردید (اشکال ۲-۱، ۲-۲، ۲-۳ و ۲-۴). ابتدا علائم بالینی مورد بررسی قرار گرفته و بیومتری (زیست‌سنجی) ماهیان انجام شد و تمامی اطلاعات مربوط به نمونه یادداشت گردید. سپس در شرایط استریل از اندام‌های داخلی ماهی شامل کلیه، طحال و آبشش نمونه برداری شد. نمونه‌های بافتی برای بررسی‌های بافت‌شناسی در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند و نمونه‌های بافتی مربوط به کشت سلولی و PCR تا هنگام آزمایش در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. طبق دستورالعمل استاندارد سازمان OIE نمونه‌ها پس از هموژن کردن بر روی تیره‌های سلولی حساس EPC و BF2 تلقیح شده و سپس آزمایشات تشخیصی RT-PCR و IFAT انجام گرفت.



شکل ۲-۱- مزرعه پرورش ماهی گرمابی در اطراف شهر رشت



شکل ۲-۲- تلفات ماهی فیتوفاگک در مزرعه پرورش ماهی گرمابی در اطراف شهر رشت



شکل ۲-۳- اندازه گیری دما، اکسیژن و pH با استفاده از مولتی متر در مزرعه پرورش ماهی گرمابی در اطراف شهر رشت



شکل ۲-۴- صید ماهی فیتوفاگ توسط ماشک در مزرعه پرورش ماهی گرمابی در اطراف شهر رشت

### ۲-۳-۲- کشت سلول

#### تهیه محیط کشت EMEM و تولید تک لایه سلولی

به منظور تهیه یک لیتر محیط کشت طبق دستورالعمل شرکت سازنده ۹/۶ گرم پودر MEM، گرم ۱/۲ بی کربنات، ۱۰ میلی لیتر پنی سیلین- استرپتومایسین و ۱۰۰ میلی لیتر سرم جنین گاوی در ۸۷۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و پس از حل شدن کامل، استریل گردید. فرایند استریل کردن محیط کشت، با استفاده از فیلترهای سر سرنگی با قطر منافذ  $0.2\mu\text{m}$  و در زیر هود میکروبیولوژی انجام پذیرفت. پس از تهیه محیط کشت و اندازه گیری pH، محیط کشت جهت تهیه کشت سلولی تک لایه مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه کشت سلولی تک لایه تازه، از فلاسک های  $25\text{cm}^2$  استفاده شد. پس از ترپسینه کردن، تک لایه های سلولی به همراه ۱۵-۲۰ mL محیط EMEM از فلاسک های قدیمی به فلاسک های جدید منتقل گردید. سپس فلاسک ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  ۲۸ گرما گذاری شد.

#### تکثیر آزمایشگاهی SVCV به عنوان کنترل مثبت

در این مطالعه از سویه استاندارد ویروس ویرمی بهاره کپور، سویه شماره ۵۶/۷۰ با شماره ثبت ژن (S30) Z37505/1 (Stone et al., 2003) که از آزمایشگاه مرجع بیماری های ماهیان اتحادیه اروپا واقع در کشور دانمارک تهیه شد به عنوان کنترل مثبت آزمایشات استفاده گردید. به منظور تکثیر ویروس، پس از ذوب کردن ویال حاوی نمونه لیوفیلیزه SVCV با استفاده از PBS، محلول آماده ویروسی با استفاده از فیلترهای سر سرنگی  $0.45\mu\text{m}$  فیلتر شد و به میزان ۲-۱/۵ میلی لیتر به فلاسک های حاوی سلول های رشد یافته EPC اضافه گردید.

تمامی فلاسک ها در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  گرما گذاری شده و به مدت هفت روز جهت مشاهده آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

### آماده سازی پلیت های کشت سلولی ۲۴ و ۹۶ خانه و نحوه تلقیح ویروس

جهت آماده سازی پلیت های کشت سلولی ۲۴ و ۹۶ خانه، پس از آماده سازی سلول های EPC و BF2 در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربع محیط کشت موجود در فلاسک ها با استفاده از پیپت های استریل یکبار مصرف خارج گردید. سپس ۵ میلی لیتر تریپسین حاوی EDTA به منظور جداسازی سلول ها از کف فلاسک، به هر فلاسک اضافه شد و پس از چند دقیقه تریپسین از فلاسک ها خارج گردید. در مرحله بعد حدود ۵۰ میلی لیتر محیط کشت EMEM حاوی بافر تریس به فلاسک ها افزوده شد. پس از چندین بار مخلوط کردن محیط کشت با سلول ها به کمک پیپت، محتوی فلاسک ها به پلیت های ۲۴ و ۹۶ خانه انتقال یافت. به هر یک از خانه های پلیت های ۲۴ خانه ۱/۵ میلی لیتر و به هر یک از چاهک های پلیت های ۹۶ خانه ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول های EPC افزوده شد. پس از بستن درب پلیت ها، تمامی پلیت ها در یک محفظه مرطوب قرار داده شده و در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت پلیت ها از لحاظ نحوه رشد سلول ها مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل تلقیح ویروس به سلول های EPC با رعایت اصول امنیت زیستی و در زیر هود میکروبیولوژی کلاس II انجام پذیرفت.

### جداسازی ویروس (Virus Isolation)

#### الف- تلقیح نمونه بر روی تیره سلولی EPC و BF2

بافت های هدف شامل کلیه، طحال و آبشش به نسبت ۱/۱۰ W/V در محیط EMEM حاوی ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین و ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین قرار داده شد و به کمک هاون چینی استریل کاملاً هوموژن گردیدند. نمونه های هوموژن شده درون لوله های فالكون درب دار ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  با دور  $2000 \times g$  سانتریفوژ گردیدند.

مایع رویی جدا گردیده و با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر (CHMLab) فیلتر گردید. ۱۵۰ میکرولیتر از هوموژن های بافتی فیلتر شده با استفاده از پیپت یکبار مصرف فیلتردار به پلیت های ۲۴ خانه حاوی سلول های EPC و BF2 رشد یافته در محیط کشت EMEM واجد ۱۰٪ سرم جنین گاوی و بافر تریس در سه رقت و سه تکرار تلقیح شدند.

پلیت های مذکور در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند.

پس از ۲۴ ساعت پلیت ها به دمای  $15^{\circ}\text{C}$  انتقال یافتند.



**ب) بررسی سلول‌های تلقیح شده**

۱- سلول‌های تلقیح شده به مدت ۷ روز در زیر میکروسکوپ معکوس<sup>۱</sup> جهت بررسی بروز آثار آسیب‌های سلولی<sup>۲</sup> بررسی گردیدند.

نکته: در صورت عدم بروز آسیب سلولی، طبق دستورالعمل OIE از پلیت‌ها نمونه برداری شده و دو بار کشت ثانویه یا پاساژ کور انجام پذیرفت.

**ج) تیتراسیون ویروس**

به منظور تیتراسیون ویروس نمونه ویروسی خالص سازی شده به روش سریالی رقیق سازی گردید. به این منظور در یک پلیت ۹۶ خانه خالی، نمونه ویروس خالص سازی شده با استفاده از محیط EMEM به صورت سریالی و با ضریب رقت ۰/۱ از رقت  $10^{-1}$  تا  $10^{-8}$  رقیق سازی گردید. سپس نمونه‌های رقیق شده در شش تکرار به پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی تیره سلولی EPC تلقیح شدند. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره گردید، حجم تلقیح نمونه به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ۲۰ میکرولیتر می‌باشد. در ضمن خانه‌های تلقیح نشده نیز در هر رقت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت تیتراسیون پس از تلقیح در یک محفظه مرطوب قرار داده شده و به دمای  $15^{\circ}\text{C}$  انتقال یافت. تمامی خانه‌های تلقیح شده به مدت هفت روز و به صورت روزانه از نظر بروز آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آنان ثبت گردید. در پایان روز هفتم تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed & Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتراسیون به صورت TCID<sub>50</sub>/mL بیان گردید. طبق تعریف، TCID<sub>50</sub>/mL غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه‌های پلیت کشت سلولی گردد.

جهت تعیین TCID<sub>50</sub>/mL تعداد موارد بروز آثار آسیب سلولی در هر یک از رقت‌های ویروسی در پلیت ۹۶ خانه بررسی شده و به صورت درصد بیان گردید. در نهایت نتایج حاصله در فرمول زیر قرار داده شد.

$$\text{TCID}_{50}/\text{mL} = \text{Anti log} [-1 - \left( \frac{\text{مجموع درصد آسیب سلولی رقت های مختلف}}{100} - 0.5 \right)]$$

۲- در صورت مشاهده آسیب سلولی، پلیت‌ها جهت تشخیص ماهیت ویروس جهت انجام آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم و PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

<sup>۱</sup> . Invert

<sup>۲</sup> . Cytopathic effect

### آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم (IFAT) بر روی کشت سلولی

این آزمایش جهت ردیابی آنتی ژن ویروسی در کشت‌های سلولی تک لایه به کار رفته و یکی از آزمایشات تأییدی نتایج کشت سلولی می‌باشد (OIE, 2012). مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آنتی آنتی بادی انجام شد:

سلولهای تیره EPC در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در  $15^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری گردیدند. پس از رشد سلول‌ها و پوشیده شدن حداقل ۷۰٪ از کف پلیت توسط آنها، سوسپانسیون هوموژن بافتی فیلتر شده، که قبلاً تهیه گردیده بود، به چاهک‌های پلیت‌ها تلقیح گردید و پلیت‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در  $15^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شدند.

محیط کشت روی سلول‌ها کاملاً تخلیه گردید.

۳۰۰ میکرولیتر متانول سرد با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به هر یک از چاهک‌های پلیت به مدت ۱۵ دقیقه اضافه گردید تا سلول‌ها کاملاً تثبیت شوند.

پلیت‌ها به صورت درب باز زیر هود کلاس II قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند.

محلول آنتی بادی مونوکلونال ضد SVCV (ساخت آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا واقع در دانشگاه تکنیکال دانمارک) به نسبت ۱:۱۰۰ با PBS رقیق شده و بر روی تک لایه سلولی قرار داده شد.

پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و درون یک محفظه مرطوب قرار گرفتند.

محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و چهار بار با استفاده از (PBST) PBS-twin80 شستشو داده شدند.

آنتی بادی‌های ضد ایمونوگلوبولین IgG خرگوشی کونژوگه شده با فلئورسین ایزوتیوسیانات (ساخت شرکت Razi Biotech) بر روی تک لایه سلولی قرار داده شد.

پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و درون یک محفظه مرطوب قرار گرفتند.

پلیت‌ها پس از شستشو در زیر میکروسکوپ فلورسانت و تحت نور U.V جهت مشاهده نقاط درخشان مورد بررسی قرار گرفتند.

### ۳-۲-۳-آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR

این آزمایش به دو صورت PCR و RT-PCR برای تکثیر DNA ویروس KHV و RNA رابدوویروس کارپو و رتوویروس آمور با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

### استخراج RNA

جهت استخراج RNA از کیت RNeasy Qiagen استفاده گردید.

در شرایط استریل بافت‌های ماهیان شامل کبد، کلیه، طحال، آبشش و روده جداسازی گردیدند.

۳۰۰ میلی گرم از نمونه‌های بافتی درون بافری متشکل از ۱۰ میلی لیتر بافر RLT و ۱۰۰ میلی لیتر بتا مرکاپتو اتانول (BME) قرار داده شده و به کمک قیچی نوک تیز کاملاً خرد شدند.

هوموژن‌های حاصله به مدت ۳ دقیقه و در دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه<sup>۳</sup> ( $12000 \times g$ ) سانتریفوژ گردیدند.

۷۰۰ میکرولیتر مایع رویی با ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به آرامی مخلوط شد.

۷۰۰ میکرولیتر از محلول حاصله به درون میکروتیوب‌های فیلتردار موجود در کیت انتقال داده شد و بلافاصله در دور  $8000 \times g$  (۱۰۰۰۰rpm) و به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفوژ گردید.

محلول زیر فیلترها دور ریخته شده و ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی RW1 که حاوی اتانول می‌باشد بر روی فیلترها اضافه شده و به مدت ۱۵ ثانیه در دور  $8000 \times g$  سانتریفوژ گردید.

محلول زیر فیلترها دور ریخته شده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر RPE درون ستون ریخته شده و به مدت ۱۵ ثانیه و دور  $8000 \times g$  سانتریفوژ گردید.

محلول زیر فیلترها دور ریخته شده و مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر بافر RPE درون ستون ریخته شده و به مدت ۲ دقیقه در دور  $8000 \times g$  سانتریفوژ گردیدند.

محلول زیر فیلترها دور ریخته شده و فیلترها بر روی میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری جدید گذاشته شدند و به مدت یک دقیقه با دور  $12000 \times g$  سانتریفوژ گردیدند.

فیلترها بر روی میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری جدید قرار داده شده و میکروتیوب‌های قبلی حذف شدند.

۳۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر RNase-free (DEPC-Distilled Water) بر روی غشاء فیلترها ریخته شده و به مدت یک دقیقه در دور  $8000 \times g$  سانتریفوژ شدند.

فیلترها برداشته و حذف گردیدند.

آنچه در میکروتیوب‌ها باقی مانده است حاوی RNA استخراج شده می‌باشد.

### استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت تجاری<sup>۴</sup> ساخت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شرح زیر استفاده شد:

۱- در ابتدا هر یک گرم نمونه بافتی در ۵ میلی لیتر محیط کشت<sup>۵</sup> EMEM با کمک هاون چینی کاملاً هوموژن گردیده و ۳۰۰ میکرولیتر از هوموژن حاوی DNA کلی بافت و ویروس به ستون استخراج منتقل گردید.

<sup>۳</sup> . Revolutions per minute

<sup>۴</sup> .DNeasy Blood & Tissue

<sup>۵</sup> .Egls minimum essential medium

۲- ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه کرده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر AL (بدون اتانول) در داخل میکروتیوب حاوی مواد بالا ریخته شد و بوسیله ورتکس کاملاً مخلوط شده و بعد در دمای  $56^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد.

۳- پس از اینکه نمونه ها کاملاً لیز و یکنواخت شد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ تا ۱۰۰٪ به نمونه اضافه کرده و بوسیله ورتکس مخلوط گردید.

۴- تمام مواد موجود در میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری مرحله ۳ را در ستون فیلتردار مخصوص کیت که در داخل میکروتیوب ۲ میلی لیتری قرار دارد، انتقال داده و در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نموده، سپس ستون فیلتر دار را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تمیز منتقل کرده و میکروتیوب قبلی به همراه مواد داخل اش دور انداخته شد.

۵- ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW1 به ستون فیلتردار اضافه شده و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و دوباره ستون فیلتر دار را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تمیز منتقل کرده و میکروتیوب قبلی به همراه مواد داخل آن دور انداخته شد.

۶- دوباره ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW2 به ستون فیلتردار اضافه شده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید و دوباره ستون فیلتردار را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تمیز منتقل کرده و میکروتیوب قبلی به همراه مواد داخل آن دور انداخته شد.

۷- ستون فیلتر دار را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل که در کیت موجود نیست قرار داده و ۲۰۰ میکرولیتر بافر AE به آن اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید سپس با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۸- مجدداً مرحله ۷ در یک میکروتیوب تمیز انجام شد تا بیش از ۸۵٪ از DNA در این دو مرحله استخراج گردد. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در آزمون PCR در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.



۲-۵- محلول‌های استفاده شده در مراحل مختلف استخراج DNA

### انتخاب پرایمر

مراحل PCR یا تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از جفت پرایمرهای زیر صورت گرفت:

جدول ۱-۲- پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در واکنش PCR

مرجع	نام پاتوژن	PCR آمپلیکون (bp)	سکانس پرایمر (5'-3')	مشخصات
				نام جفت پرایمر
Koutna (2003)	رابدوویروس س کاریبو	۴۷۰	5'-GCC TAA ATG TGT TGA TGG AAC G-3'	SVCF
			5'-GGA TAA TAT CGG CTT GGA AAG C-3'	SVCR
OIE,2013	KHV	۲۹۲	5'- GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3'	KHVF2
			5'-GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3'	KHVR2
Yulin, NACA	GCRV	۶۹۷	5'-CGC GTT CGC TGA TGT AAG G-3'	GV873S10 F
			5'-CCC CGA TCA TCA CCA CGA T-3'	GV873S10 R
Li. 1997	GCRV	۳۲۰	5'-AGTTCTCAAAGCTGAGACGG-3'	PS6F
			5'-ACGTGCGATTGGAAGAGCTT-3'	PS6R

● همه پرایمرها به وسیله شرکت A/S در دانمارک از طریق شرکت ژن فن آوران ساخته شدند.

#### ۴-۳-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR)

مخلوط مواد مصرفی واکنش RT-PCR بر اساس تعداد نمونه و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Qiagen) بر اساس جدول ذیل آماده گردید.

#### جدول ۲-۲- مواد مصرفی مورد استفاده در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس برای SVCV و GCRV

5X buffer	۵ $\mu$ L
dNTPs	۱ $\mu$ L
Forward primer	۱ $\mu$ L
Reverse primer	۱ $\mu$ L
Reverse transcription enzyme mix	۱ $\mu$ L
DEPC- Distilled Water	۱۳ $\mu$ L
حجم نهایی میکس مواد مورد استفاده در هر واکنش	۲۲ $\mu$ L

به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری RNase free برداشته و مشخصات نمونه‌ها بر روی آنان ثبت گردید.

۲۲  $\mu$ L از میکس تهیه شده به همه میکروتیوب‌ها اضافه گردید.

به هر میکروتیوب ۳  $\mu$ L از RNA استخراج شده از نمونه یا کنترل مثبت و منفی اضافه گردید.

واکنش RT-PCR طبق پروتکل برنامه ریزی ذیل در دستگاه ترموسایکلر BioER XP cycled مدل 6. XP. TC اجرا گردید:

ابتدا دمای C ۵۰<sup>۰</sup> به مدت یک دقیقه، دمای C ۵۰<sup>۰</sup> به مدت ۳۰ دقیقه و سپس C ۹۵<sup>۰</sup> به مدت ۳ دقیقه. طی این مراحل cDNA ساخته شد.

در ادامه مراحل سنتز اسیدنوکلئیک در ۳۵ سیکل انجام پذیرفت. هر سیکل شامل اعمال دمای C ۹۴<sup>۰</sup> به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت (Denaturation) DNA، دمای C ۵۰<sup>۰</sup> به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال رشته‌های اسیدنوکلئیک<sup>۲</sup> و سپس دمای C ۷۲<sup>۰</sup> به مدت یک دقیقه جهت پلیمریزاسیون<sup>۳</sup> بود. مرحله پایانی واکنش شامل اعمال دمای C ۷۲<sup>۰</sup> به مدت ۱۰ دقیقه بود.

<sup>۲</sup> Annealing

<sup>۳</sup> Polymerization

۵-۳-۲- واکنش زنجیره ای پلیمر از (PCR) با استفاده از پرایمر اختصاصی KHV مخلوط مواد مصرفی واکنش RT-PCR بر اساس تعداد نمونه و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Qiagen) بر اساس جدول ۲-۳ آماده شد و چرخه های حرارتی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طبق جدول ۲-۴ انجام شد.

جدول ۲-۳- نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای PCR

ماده	مقدار	غلظت مواد	مقدار برای واکنش 25 میکرولیتری
DNA		۵۰ نانوگرم	۲ میکرولیتر
آنزیم پلیمراز		۵U/μ	۰/۵ میکرولیتر
dNTPs		25 میلی مولار	۱ میکرولیتر
Mgcl2		۲۵ میلی مولار	۱ میکرولیتر
بافر PCR		۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
پرایمر Forward		۱۰ میکرو مولار	۱/۵ میکرولیتر
پرایمر Reverse		۱۰ میکرو مولار	۱/۵ میکرولیتر
آب مقطر		-	تا 25 میکرولیتر

جدول ۲-۴- چرخه های حرارتی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

پرایمر	مراحل	درجه حرارت (°C)	زمان	مختصات تعداد چرخه (سیکل)
KHVF2/R2	واسرشت شدن آغازین <sup>۹</sup>	۹۴	۵ دقیقه	۱
	واسرشت <sup>۱۰</sup>	۶۰	۳۰ ثانیه	۲۸
	دمای اتصال پرایمر <sup>۱۱</sup>	۷۲	۴۵ ثانیه	
	ساخت <sup>۱۲</sup>	۹۴	۳۰ ثانیه	
	ساخت نهایی <sup>۱۳</sup>	۷۲	۷ دقیقه	۱

۶-۳-۲- آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مر از (Nested-RT-PCR) با استفاده از کیت تجاری IQ2000 (تایوان)

طبق دستورالعمل شرکت IQ2000 به شرح زیر عمل شد:

<sup>9</sup>. Initial denaturation

<sup>10</sup>. Denaturation

<sup>11</sup>. Annealing

<sup>12</sup>. Extension

<sup>13</sup>. Final extension

- ۱- میکس مواد مصرفی واکنش RT-PCR بر اساس تعداد نمونه طبق جدول ۲-۵ آماده گردید.
- ۲- ابتدا به تعداد نمونه های مورد آزمایش، میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری برداشته و مشخصات یا شماره نمونه ها روی آنها نوشته شد.
- ۳- ۸ µl از میکس تهیه شده به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری که دارای برچسب مشخصات است اضافه گردید.
- ۴- در هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری حاوی میکس ۲ µl از RNA استخراج شده نمونه یا کنترل مثبت یا کنترل منفی اضافه شد.
- ۵- واکنش RT-PCR در دستگاه ترمال سایکلر مطابق جدول ۲-۶ اجرا گردید.

جدول ۲-۵- نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش RT-PCR

ماده	غلظت مواد	مقدار مورد نیاز هر واکنش
RT-PCR Pre- mix		۷ میکرولیتر
IQzym	۲U/µl	۰/۵ میکرولیتر
RT-Enzym		۰/۵ میکرولیتر
میزان میکس مورد نیاز هر واکنش		۸ میکرولیتر

جدول ۲-۶- چرخه های حرارتی RT-PCR با استفاده از پرایمرهای کیت IQ2000

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (ثانیه)	درجه حرارت (سانتیگراد)	مرحله
۱	۱۸۰۰	۴۲	
۱	۱۲۰	۹۴	واسرشت اولیه <sup>۱۴</sup>
	۲۰	۹۴	واسرشت <sup>۱۵</sup>
۱۵	۲۰	۶۲	دمای اتصال پرایمر <sup>۱۶</sup>
	۳۰	۷۲	ساخت <sup>۱۷</sup>
۱	۳۰	۷۲	ساخت نهایی <sup>۱۸</sup>
۱	۳۰	۲۰	

<sup>۱۴</sup> . Initial denaturation

<sup>۱۵</sup> . Denaturation

<sup>۱۶</sup> . Annealing

<sup>۱۷</sup> . Extention

<sup>۱۸</sup> . Final extention



۷-۳-۲- انجام Nested-PCR :

۱ - میکس Nested-PCR، طبق جدول ۲-۷ تهیه شد.

۲ - پس از اتمام RT-PCR، ۱۵ µl از میکس تهیه شده را به هر میکروتیوب ۰/۲ ml اضافه کرده و واکنش Nested-PCR بر اساس جدول ۲-۸ اجرا گردید.

جدول ۲-۷- نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش Nested-PCR

ماده	غلظت مواد	مقدار مورد نیاز هر واکنش
Nested-PCR Pre- mix		۱۴ میکرولیتر
IQzym	۲U/µl	۱ میکرولیتر
میزان میکس مورد نیاز هر واکنش		۱۵ میکرولیتر

جدول ۵- چرخه های حرارتی Nested-PCR با استفاده از پرایمرهای کیت IQ2000

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (ثانیه)	درجه حرارت (سانتیگراد)	مرحله
	۲۰	۹۴	واسرشت
۳۰	۲۰	۶۲	دمای اتصال پرایمر
	۳۰	۷۲	ساخت
۱	۳۰	۷۲	ساخت نهایی

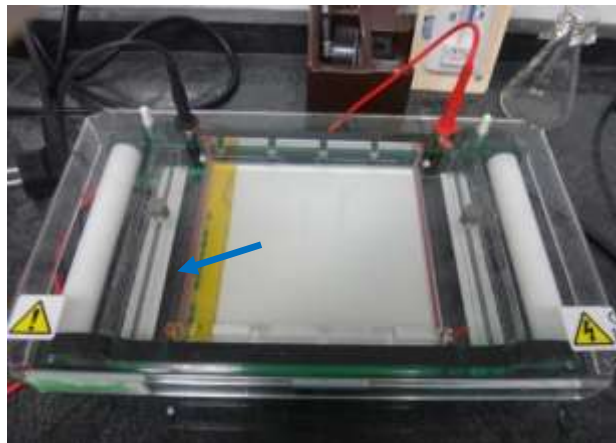
۸-۳-۲- الکتروفورز محصول PCR و عسکبرداری از ژل آگاروز

مراحل الکتروفورز در دستگاه الکتروفورز SCIE-PLAS مدل ۱۳-HV انجام پذیرفت. محصول نهایی PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی ۰/۵ µgr/ml اتیدیوم بروماید به مدت ۶۰ دقیقه و تحت ولتاژ ۱۲۰۷ الکتروفورز گردید. به منظور ساختن ژل الکتروفورز درون یک ارلن، ۲ ml TAE (Tris-Acetate-EDTA) به ۱۸ ml آب مقطر استریل اضافه شد. سپس ۴۰۰ میلی گرم پودر آگاروز به ارلن افزوده شده و بر روی حرارت تکان داده شد تا کاملاً محلول صاف و یکنواختی حاصل گردد. سپس ۴ µg اتیدیوم بروماید به ارلن اضافه گردیده و کاملاً مخلوط گردید. سپس این محلول در تانک الکتروفورز ریخته شد و در فاصله چند میلی متری از قطب منفی چاهک‌های الکتروفورز ایجاد گردید.

در مرحله بعد درون تانک الکتروفورز بافر TAE ریخته شد. سپس ۵ µl محصول RT-PCR با ۳ µl بافر بارگذاری<sup>۱۹</sup> مخلوط شده و ۳ µl از این مخلوط در چاهک‌های تعبیه شده در قطب منفی ژل ریخته شد. ضمن

اینکه در اولین چاهک نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت Vivantis) بدون افزودن بافر بارگذاری ریخته شد.

پس از بستن درب تانک، ولتاژ ۱۲۰V به مدت ۶۰ دقیقه بر روی ژل اعمال گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل به دستگاه آشکارساز ژل Uvipro (gold) انتقال داده شده و با تابش پرتو U.V پس از بررسی کنترل‌های مثبت و منفی، تشکیل باندهای DNA در محل ۴۷۰bp مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲-۶- تانک الکتروفورز افقی، نمونه‌ها همراه لودینگ بافر ۶X به چاهک انتقال داده شدند (پیکان آبی)

### ۹-۳-۲- آزمایش آسیب شناسی بافتی

ابتدا اندام‌های کبد، طحال، کلیه و آبشش از ماهیان مورد آزمایش جداسازی شده و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. محلول فرمالین پس از ۲۴ ساعت تعویض گردید و به مدت دو هفته در تاریکی قرار داده شد تا تثبیت بافت به خوبی صورت پذیرد. مراحل آماده سازی بافت شامل آبگیری و شفاف سازی با رقت‌های مختلف اتانول و گزیلول در دستگاه پردازنده بافت (Tissue processor) اتوتکنیکوم به مدت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. سپس نمونه‌ها در قالب‌های فلزی ۳×۲ سانتی متری قرار گرفته و قالب‌ها با پارافین مذاب پر شدند. پس از خنک شدن و جامد شدن پارافین، بلوک‌های تهیه شده به منظور جلوگیری از شکسته شدن حین برش گیری، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C قرار داده شدند. در مرحله بعدی بلوک‌های تهیه شده توسط دستگاه میکروتوم مقاطع بافتی و با ضخامت برش ۴μm برش گیری شدند. برش‌ها بلافاصله پس از تهیه به روی اسلاید منتقل گردیدند. پس از انتقال برش‌ها به روی لام، همه لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض حرارت خشک با دمای ۱۰۰°C قرار داده شده و سپس به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی گردید (Schrek and Moyle 1990).

- قرار دادن لام‌ها به مدت ۳ دقیقه در گزیلول (۱۰۰٪) دو بار
- قرار دادن لام‌ها به مدت ۳ دقیقه در پروپانول (۱۰۰٪) دو بار
- شستشو با آب مقطر

- قراردادن لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین
- شستشو با آب مقطر و قراردعی لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر
- قرار دادن لام‌ها به مدت چند ثانیه در محلول اسید الکل شامل ۶۰٪ پروپانول، ۲۹٪ آب مقطر و ۱٪ اسید کلریدریک
- شستشو با آب مقطر
- قراردادن لام‌ها به مدت یک دقیقه در رنگ انوزین
- شستشو با آب مقطر
- تکرار مرحله ۲
- تکرار مرحله ۳

پس از انجام رنگ آمیزی، دور تا دور نمونه‌ها به چسب کانادا بالزام آغشته شده و سپس لامل گذاری گردیدند. پس از آماده سازی لام هیستوپاتولوژی نمونه‌های بافت‌های مختلف زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی‌های متفاوت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

#### ۱۰-۳-۲- میکروسکوپ الکترونی

نمونه‌های بافتی در اندازه یک سانتی متر مکعب بریده شده و در گلو تار آلدهید ۳٪ فیکس شد و پس از گذشت ۲ ساعت، ۳ بار با محلول سدیم کاکودیلات ۱٪ شستشو شده و مرحله تثبیت دوم با کمک اسمیوم تتراکساید انجام گرفت. مقاطع اولترا میکروسکوپی با کمک اولترا میکروتوم تهیه شده و با میکروسکوپ الکترونی به روش TEM بررسی قرار گرفت.

#### ۱۱-۳-۲- مطالعات بیماری‌زایی<sup>۲۰</sup>

بر اساس دستورالعمل OIE به منظور تایید تشخیص بیماری، سوپرناتانت سلولهای آلوده پس از مشاهده CPE، سانتریفوژ شده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند. سپس ماهیان حساس با محلول فیلتر شده مواجه (Challenge) گردیدند. در صورت ایجاد علائم بیماری مراحل تایید تشخیص با کمک روش‌های کشت سلولی، آزمایش آنتی بادی درخشان و آزمایش خنثی سازی سرم انجام گرفت.

### ۱۲-۳-۲- کشت باکتری

ماهیان در زیر هود لامینار کلاس II در شرایط کاملاً آسپتیک بعد از ضد عفونی سطح شکمی با اتانل ۷۰٪، کالبدگشایی شدند. سطح شکمی با استفاده از قیچی، اسکالپل و پنس استریل باز شد و با لوپ (آنس) که بوسیله شعله استریل شده بود از اندامهای داخلی ماهی شامل کبد، طحال و کلیه در محیط آگار خوندار<sup>۲۱</sup> (تهیه شده از ۱۰٪ خون دفیبرینه گوسفند، شرکت داروآش، ایران) کشت داده شد سپس پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای °C ۳۰ قرار گرفتند. پس از اطمینان از خلوص کلنی ها، کلنی های رشد یافته بر اساس رنگ، شکل و اندازه بررسی شدند و رنگ آمیزی گرم و آزمایشات تکمیلی با استفاده از تست های بیوشیمیایی دستی بر روی کلونی های خالص انجام شد.

---

<sup>21</sup> . Blood agar

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- مشاهدات بالینی

در مراجعه به مزارع استان گیلان در طول فصل پرورش سالهای ۹۱-۱۳۹۰، نمونه برداری از ۴۱۱ قطعه ماهی فیتوفاگ و آمور دارای علائم بالینی با محدوده وزنی ۵ تا ۲۳۰۰ گرم از ۸۳ مزرعه دارای تلفات شدید صورت گرفت. علائم بالینی در مزارع مختلف بسیار متفاوت بود. در برخی مزارع علائمی همچون خونریزی‌های زیر جلدی در پهلوها، پایه باله‌ها یا در کل باله و قرمز شدن زیر شکم و روی سرپوش آبششی، آگزوفتالمی خفیف، خونابه در محوطه شکمی (به رنگ‌های زرد، شفاف یا قرمز) و خونریزی‌های نقطه‌ای بر روی امعاء و احشاء و بیحالی در ماهیان فیتوفاگ و در برخی موارد زرد یا کمرنگ شدن کامل پوست مشاهده شد و در تعداد کمی از ماهیان آمور علائم خونریزی‌های نقطه‌ای پوست و احشاء و آسیت (آب آوردگی) در محوطه شکمی و در برخی ماهیان فیتوفاگ و آمور نیز کبد و آبشش کمرنگ مشاهده گردید. در موارد معدودی حالت تورم و پختگی در عضلات ماهی فیتوفاگ دیده شد. در خصوص بچه ماهیان موارد متعددی از لاغری مفرط مشاهده شد.



شکل ۳-۱ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix* خونریزی در باله‌های شکمی



شکل ۲-۳ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix* خونریزی در باله سینه ای و در سطح بدن



شکل ۳-۳ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix* آبشش کمرنگ و خونریزی در باله سینه ای



شکل ۴-۳ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix* خونریزی در روی سرپوش آبشی و پوزه و خونریزی پتشی در سطح پوست

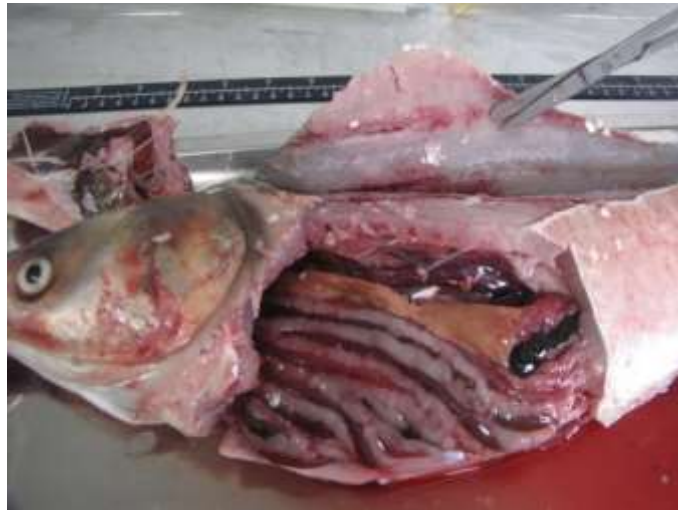


شکل ۳-۵- ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix*، خونابه در محوطه شکمی



شکل ۳-۶ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix*، لاغری مفرط در بچه ماهیان فیتوفاگ





شکل ۳-۷ - ماهی فیتوفاگ پرورشی *Hypophthalmichthys molitrix*، کمرنگ بودن کبد و حالت تورم و پختگی عضلات در سراسر بدن



شکل ۳-۸ - ماهی سرگنده، *Aristichthys nobilis*، خونابه در محوطه شکمی



شکل ۳-۹ - ماهی سرگنده، *Aristichthys nobilis*، آسیت شفاف در محوطه شکمی





شکل ۳-۱۰- ماهی *Ctenopharyngodon idella*، کبد کمرنگ و خونابه در محوطه شکمی



شکل ۳-۱۱- ماهی *Ctenopharyngodon idella*، خونابه زرد رنگ

### ۳-۲- شرایط عمومی آب استخرها

#### رنگ آب:

رنگ آب در استخرهای دارای تلفات از کاملاً شفاف تا سبز زیتونی و زرد متفاوت بود.

#### کدورت آب:

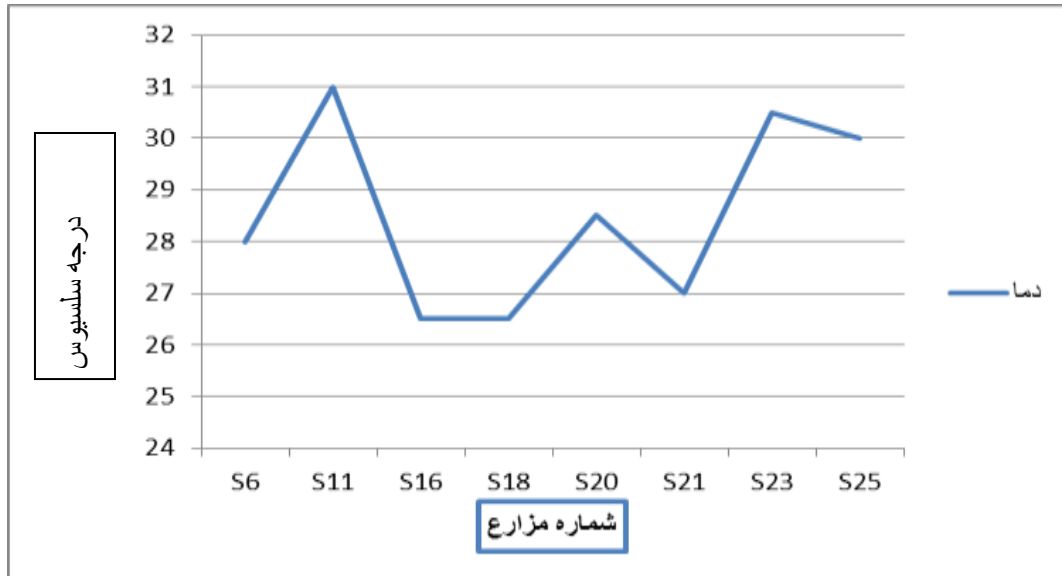
حداقل عمق قابل مشاهده با صفحه سکشی در مزارع ۴۰ سانتی متر و در چند استخر که آب آنها از غنای کافی برخوردار نبود و آب کاملاً شفاف بود تا یک متر قابل مشاهده بود.

#### منابع آبی:

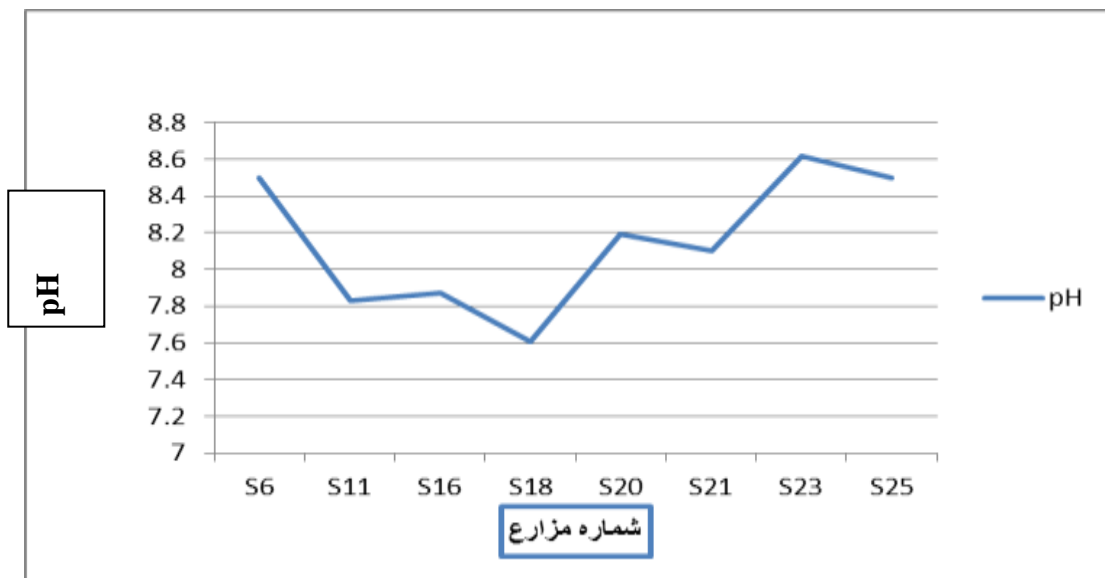
استخرهایی که از منبع چاه نیمه عمیق یا عمیق به عنوان منبع آبی استفاده می کردند در مقایسه با آنها که از آب کانال و رودخانه بهره مند بودند تلفات بسیار کمتری داشتند.

### محدوده دمای آب، اکسیژن و pH

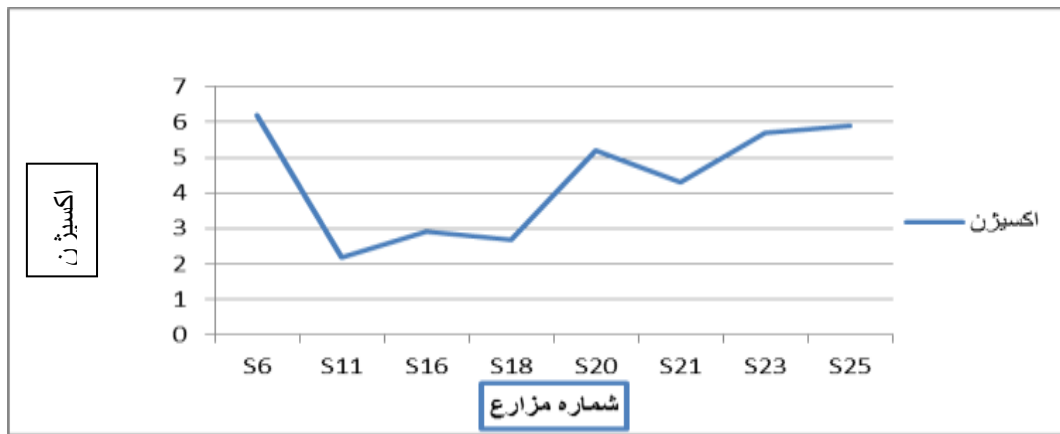
میانگین دمای آب، اکسیژن و pH در مزارع به ترتیب  $26/5-31^{\circ}\text{C}$ ،  $4/3-5/7\text{ mg/L}$  و  $7/4-9/38$  بود (نمودار ۳-۱، ۳-۲، ۳-۳).



نمودار ۳-۱- محدوده دمایی در مزارع دارای تلفات بیش از ۵۰ قطعه در روز



نمودار ۳-۲- دامنه pH در مزارع دارای تلفات بیش از ۵۰ قطعه در روز



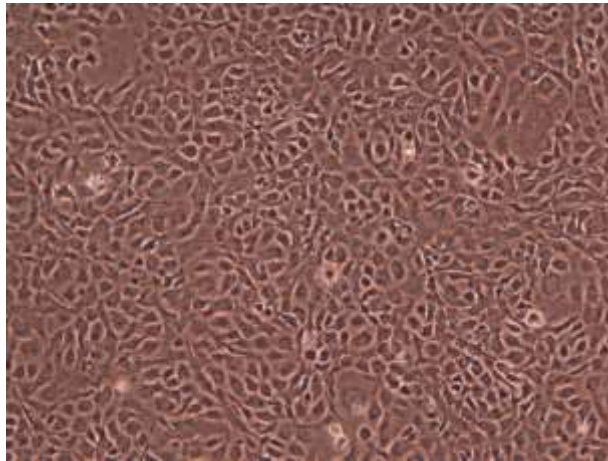
نمودار ۳-۳- دامنه اکسیژن در مزارع دارای تلفات بیش از ۵۰ قطعه در روز

### ۳-۳- کشت سلولی

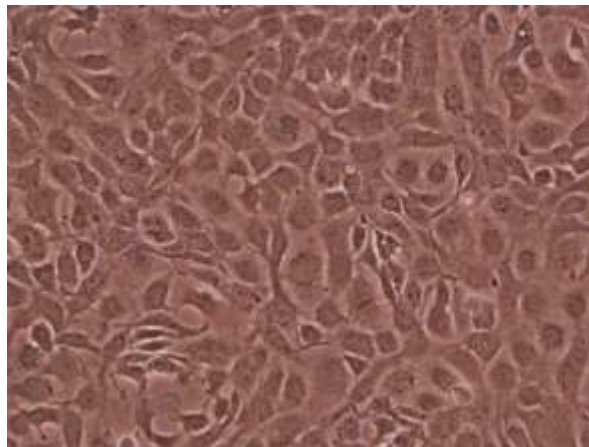
در کشت سلولی، آثار آسیب سلولی (CPE) مشکوک به بیماری SVC پس از تلقیح هوموژن بافتی ۳ ماهی فیتوفاگ بر روی تک لایه سلولی EPC بدست آمد ولی در پاساژهای بعدی علائم آسیب سلولی ایجاد نگردید. در خصوص نمونه های آمور نیز هیچگونه آثار آسیب سلولی بر روی دو تیره سلولی EPC و BF2 ایجاد نشد.



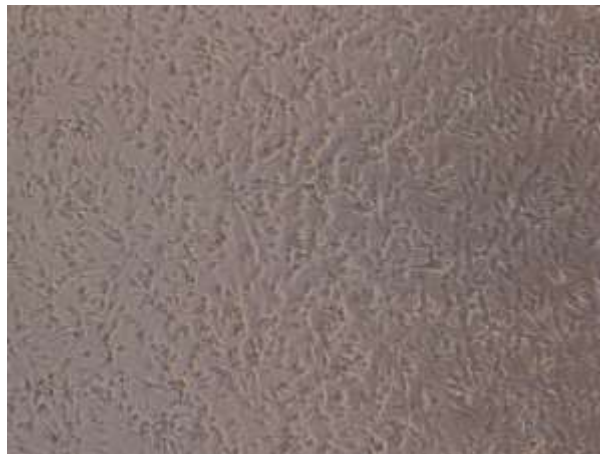
شکل ۳-۱۲- تغییرات سلولی مشکوک به SVC در تک لایه سلولی EPC مربوط به ۳ نمونه ماهی فیتوفاگ (بزرگنمایی ۴۰x)



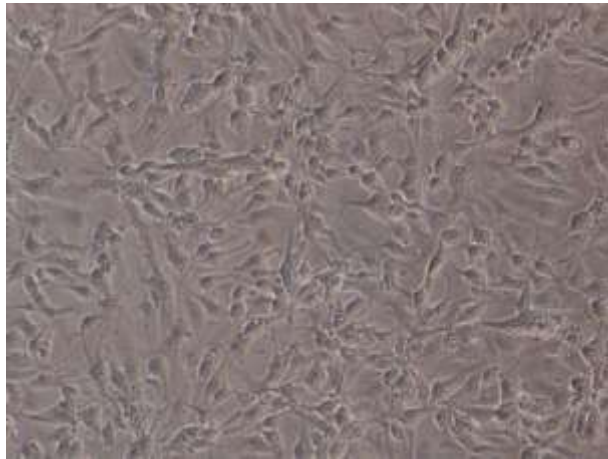
شکل ۳-۱۳ - تک لایه سلولی EPC کنترل منفی (بزرگنمایی ۱۰۰x)



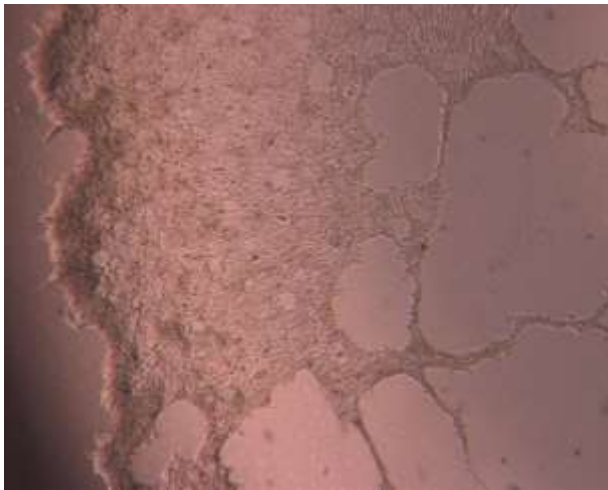
شکل ۳-۱۴ - تک لایه سلولی EPC کنترل منفی (بزرگنمایی ۲۰۰x)



شکل ۳-۱۵ - تک لایه سلولی BF2 کنترل منفی (بزرگنمایی ۱۰۰x)



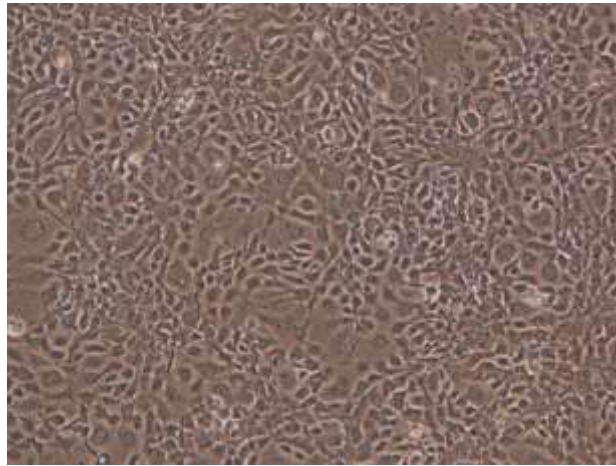
شکل ۳-۱۶- تک لایه سلولی BF2 کنترل منفی (بزرگنمایی ۲۰۰x)



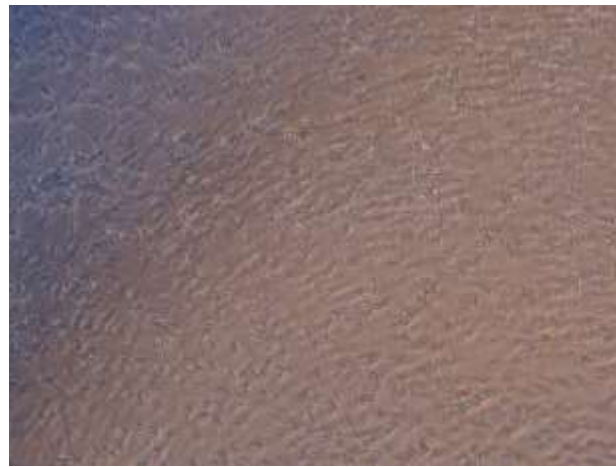
شکل ۳-۱۷- کنترل مثبت SVC بر روی تیره سلولی EPC (بزرگنمایی ۴۰x)



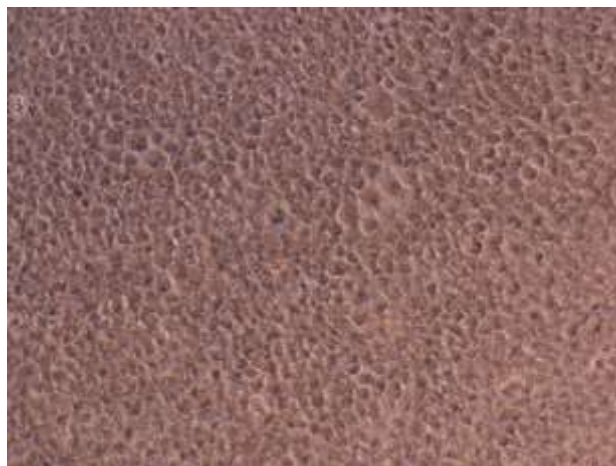
شکل ۳-۱۸- کنترل مثبت SVC بر روی تیره سلولی BF2 (بزرگنمایی ۱۰۰x)



شکل ۳-۱۹- تک لایه سلولی EPC، ۷ روز پس از تلقیح نمونه فیتوفاگک (بزرگنمایی x ۱۰۰)

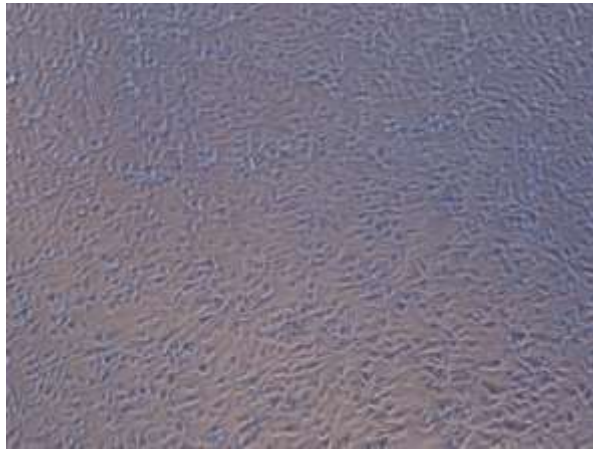


شکل ۳-۲۰- تک لایه سلولی BF2، ۷ روز پس از تلقیح نمونه فیتوفاگک بدون آثار آسیب سلولی (بزرگنمایی x ۱۰۰)



شکل ۳-۲۱- تک لایه سلولی EPC، ۷ روز پس از تلقیح نمونه آمور فاقد آثار آسیب سلولی (بزرگنمایی x ۱۰۰)





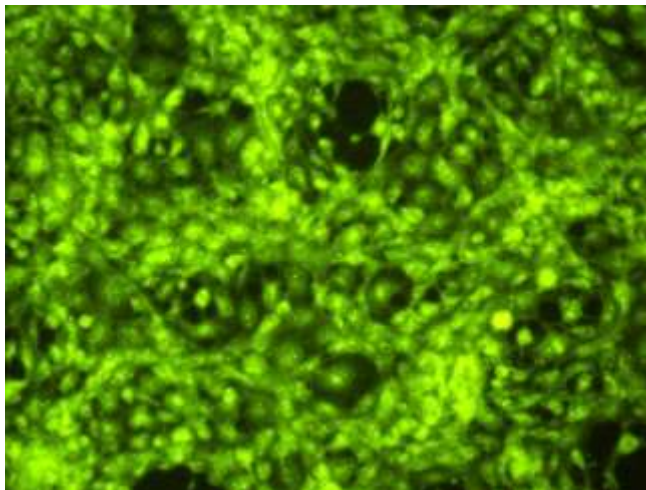
شکل ۳-۲۲- تک لایه سلولی BF2، ۷ روز پس از تلقیح نمونه آمور  
فاقد آثار آسیب سلولی (بزرگمایی x ۱۰۰)

#### ۴-۳- آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم

در آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم که با استفاده از آنتی بادی تهیه شده در آزمایشگاه رفرانس ویروس شناسی دانشگاه تکنیکال دانمارک، ۷۲ ساعت پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهی فیتوفاگ و آمور بر روی تک لایه سلولی EPC انجام شد، هیچگونه واکنشی مشاهده نگردید (اشکال ۳-۲۵ و ۳-۲۶) در حالیکه در کنترل مثبت آثار واکنش آنتی ژن و آنتی بادی به صورت نقاط فسفری درخشان دیده شد (شکل ۳-۲۴).



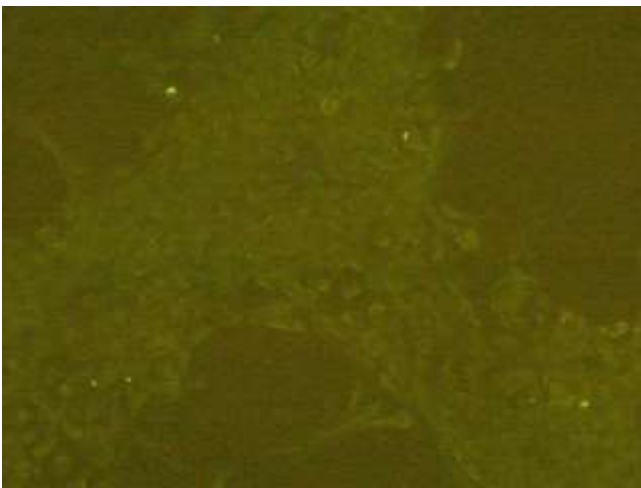
شکل ۳-۲۳- کنترل منفی آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بر روی تیره سلولی تیره EPC  
(بزرگمایی x ۲۰۰)



شکل ۳-۲۴- کنترل مثبت SVC، آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بر روی سلولهای تیره EPC (بزرگنمایی x ۲۰۰)



شکل ۳-۲۵- آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم بر روی تک لایه سلولی EPC تلقیح شده با هوموژن بافتی ماهی فیتوفاگ، ۷۲ ساعت پس از تلقیح هوموژن بافتی (بزرگنمایی x ۱۰۰)

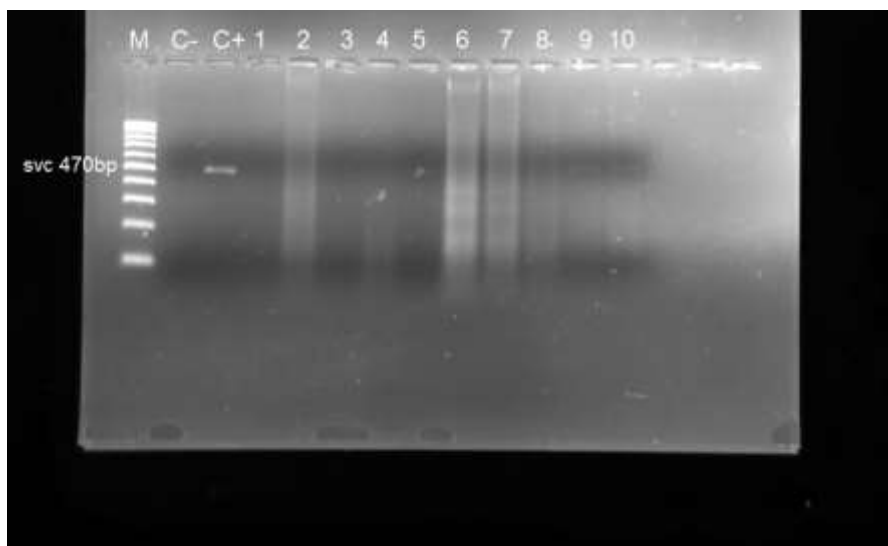


شکل ۳-۲۶- آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم بر روی تک لایه سلولی EPC تلقیح شده با هوموژن بافتی ماهی آمور، ۷۲ ساعت پس از تلقیح هوموژن بافتی و فاقد نقاط درخشان (بزرگنمایی x ۱۰۰)

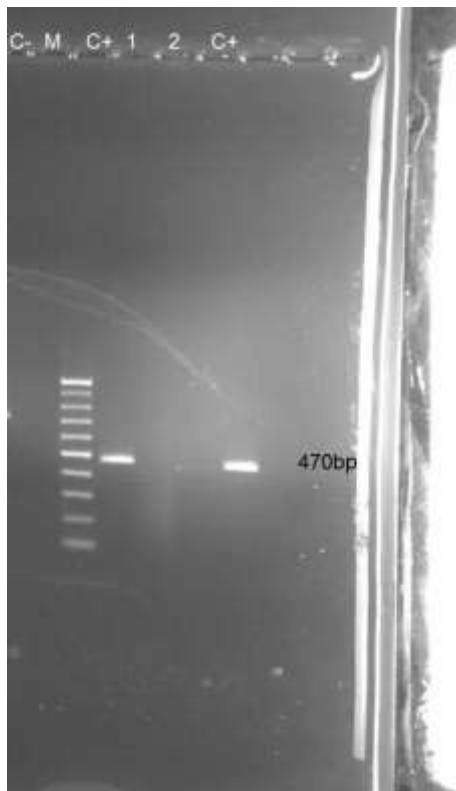


### ۵-۳- RT-PCR و PCR

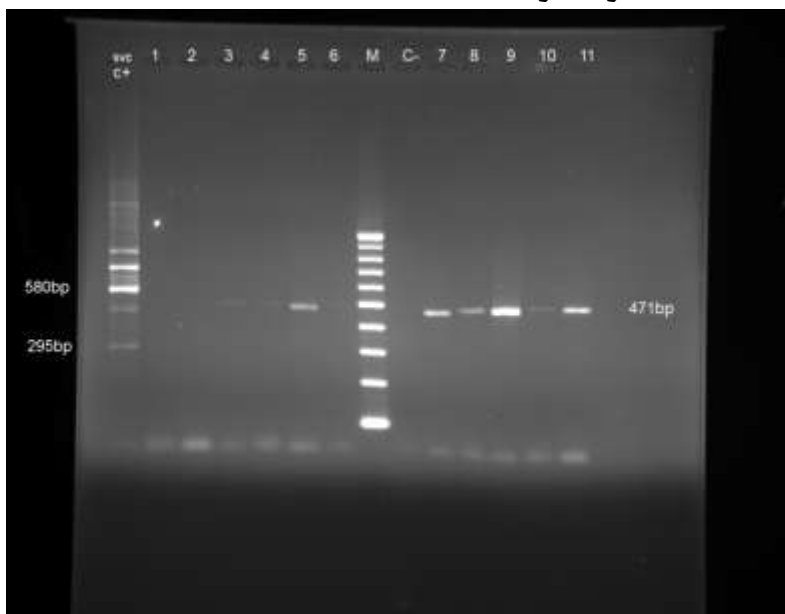
در یک نمونه ماهی فیتوفاگ در آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی KHV و در نمونه دیگر با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی SVCV، باند غیر اختصاصی مشاهده شد. امادر تکرار آزمایشات هیچیک از نمونه‌ها، بیماری‌های ویرمی بهاره کپور و کوی هرپس ویروس تایید نگردید. همچنین از هیچیک از نمونه‌های آمور نیز باند مربوط به GCRV بدست نیامد. لذا نتایج این تحقیق بر اساس دستورالعمل کیت IQ2000 و انجام PCR و RT-PCR دستی با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی حاکی از عدم وجود RNA رابدو ویروس کارپیو، رئوویروس و DNA هرپس ویروس کوی در نمونه‌های مورد آزمایش بود. به این ترتیب که در PCR دستی باند ۴۷۰ bp مربوط به SVCV، باند ۲۹۲ bp و باندهای ۶۹۷ bp و ۳۲۰ bp مربوط به GCRV در هیچیک از نمونه‌ها تایید نشد. به همین ترتیب در الکتروفورز محصول PCR مربوط به کیت‌های IQ2000 مربوط به بیماری‌های SVC و KHVD به ترتیب باندهای منفی ۴۷۱ bp و ۶۴۰ bp مشاهده شد که بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده نشانه منفی بودن نمونه‌ها است و باندهای مثبت ایجاد نگردید. به منظور تایید نتایج، ۳ نمونه مشکوک به آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا ارسال گردید که هیچیک از بیماری‌های مذکور تایید نشد.



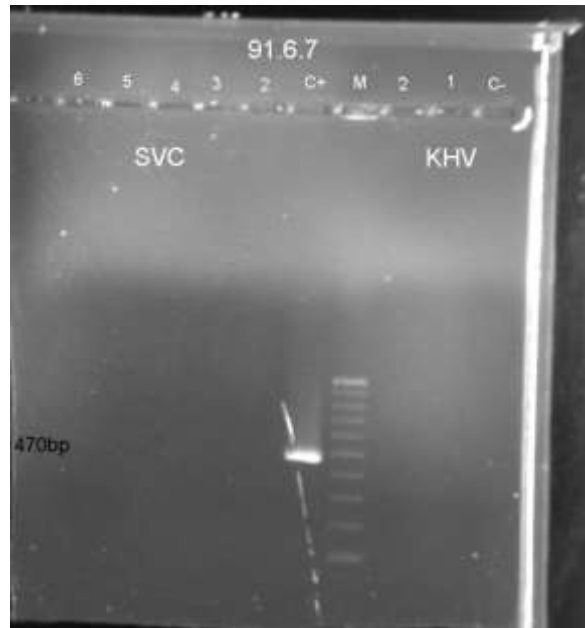
شکل ۳-۲۷- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی M = مارکو (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C- = کنترل منفی؛ C+ = کنترل مثبت؛ ستون‌های ۱ تا ۱۰ = نمونه فیتوفاگ



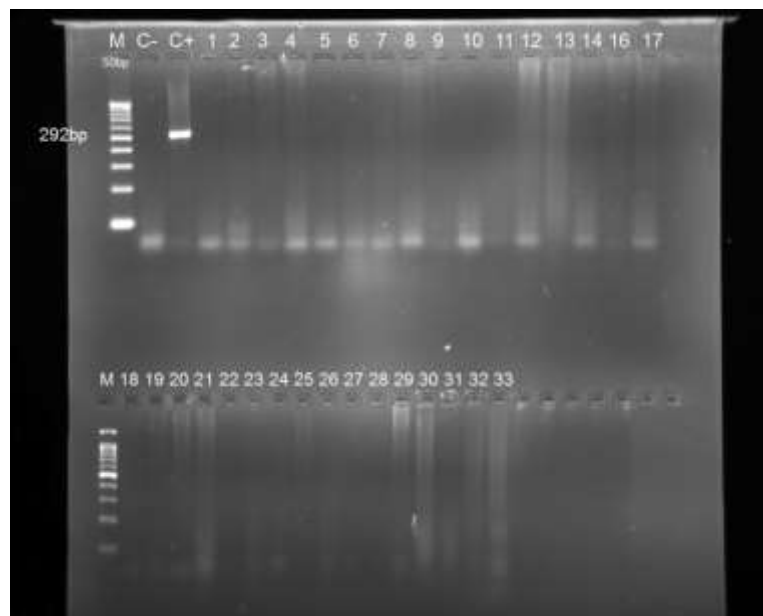
شکل ۳-۲۸- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی SVCF/R؛ C- = کنترل منفی؛ M = مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C+= کنترل مثبت؛ ستون های ۱ و ۲= نمونه آمور



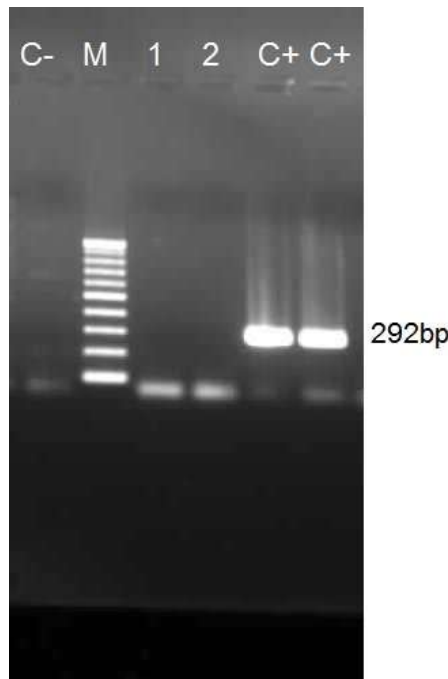
شکل ۳-۲۹- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از کیت تجاری IQ2000؛ C+ = کنترل مثبت SVCV؛ ستون های ۱ تا ۶= نمونه های آمور؛ M = مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C- = کنترل منفی؛ ستون های ۷ تا ۱۱= نمونه های فیتوفاگک دارای باند منفی ۴۷۱ bp



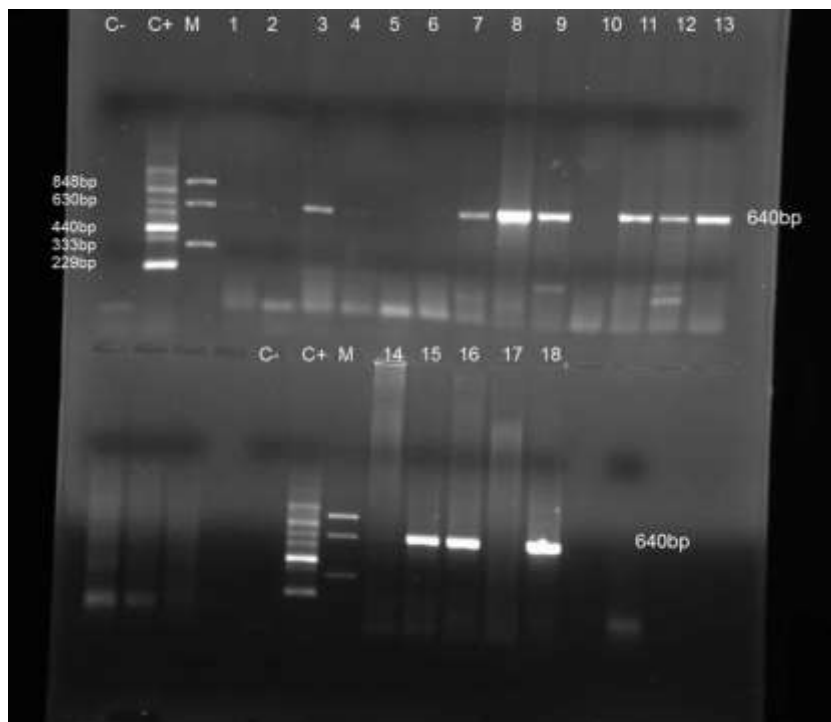
شکل ۳-۳- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی SVCF/R و KHVF2/R2؛ M = مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C- = کنترل منفی؛ C+ = کنترل مثبت SVCV؛ ستون های ۱ تا ۶ = نمونه فیتوفاگ



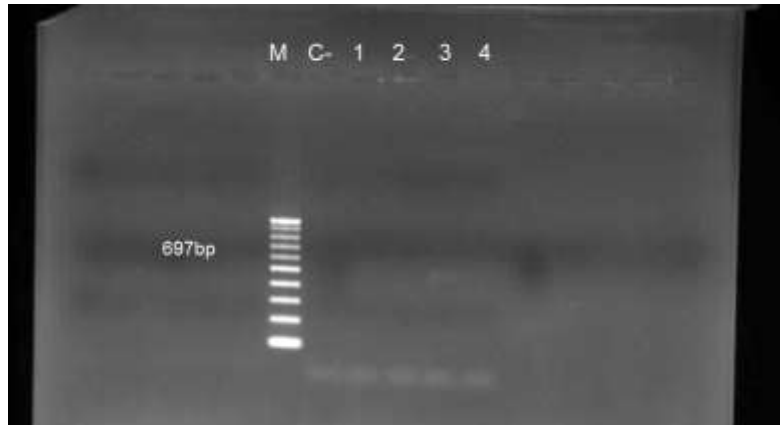
تصویر ۳-۳۱- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی KHVF2/R2؛ M = مارکر (۵۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C- = کنترل منفی؛ C+ = کنترل مثبت KHV (۲۹۲ bp)؛ ستون های ۱ تا ۳۳ = نمونه فیتوفاگ



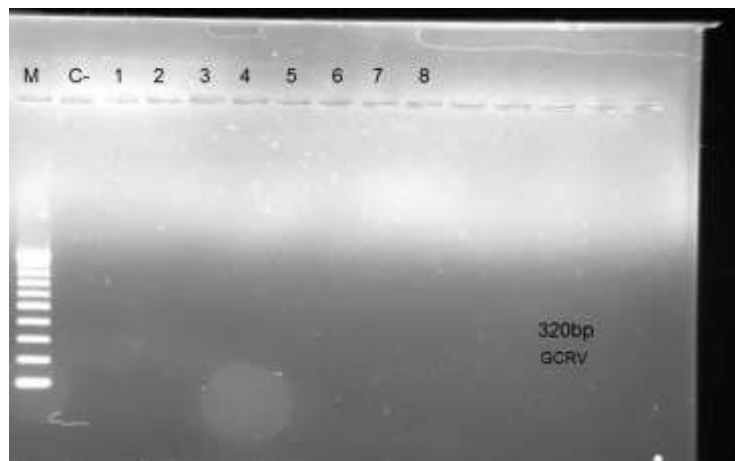
شکل ۳-۳- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی KHV2/R2؛ C- = کنترل منفی؛ M = مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ ستون های ۱ و ۲ = نمونه آمو؛ C+ = کنترل مثبت KHV (۲۹۲ bp)



شکل ۳-۳- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول PCR با استفاده از کیت تجاری IQ2000؛ C- = کنترل منفی؛ C+ = کنترل مثبت KHV؛ ستون های ۱ تا ۱۳ = نمونه های فیتوفاگ؛ M = مارکر (باند پایین ۳۳۳ bp، باند وسط ۶۳۰ bp، باند بالا ۸۴۸ bp)؛ ستون های ۱۴ تا ۱۸ = نمونه های آمو؛ دارای باند منفی ۶۴۰ bp



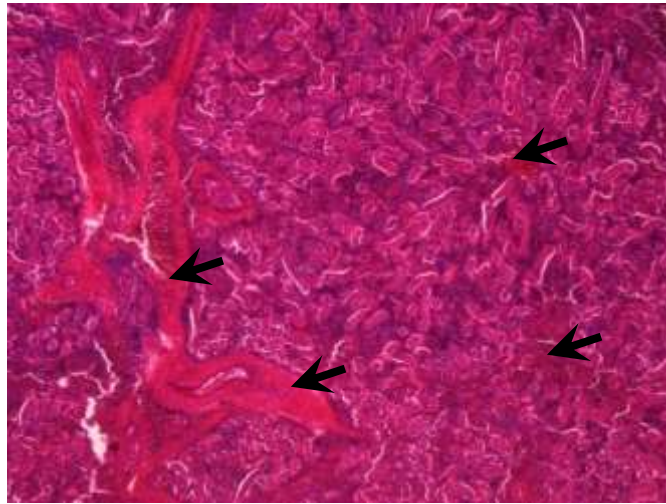
شکل ۳-۳-۳۴- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ محصول RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی (GCRV) (BP) ۶۹۷، (GV873S10F/R)؛ M: مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C-: کنترل منفی؛ ستون های ۱ تا ۴: نمونه های آمور



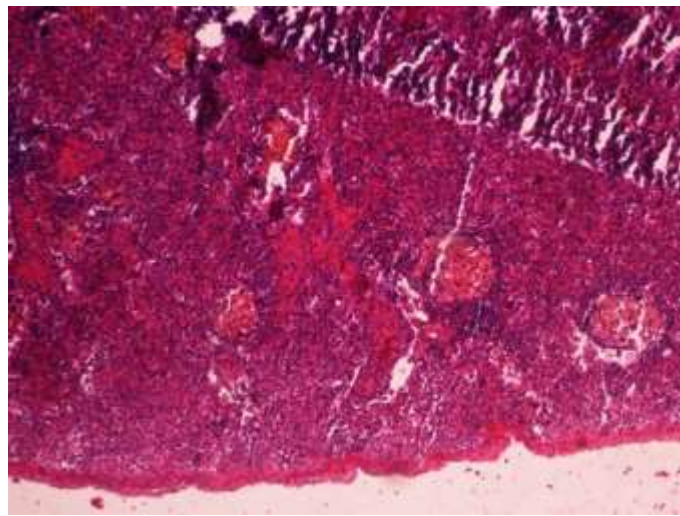
شکل ۳-۳-۳۵- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی (GCRV) (PS6F/R، ۳۲۰ bp)؛ M: مارکر (۱۰۰ bp ساخت شرکت Vivantis)؛ C-: کنترل منفی؛ ستون های ۱ تا ۴: نمونه های آمور

### ۳-۶- آسیب شناسی بافتی

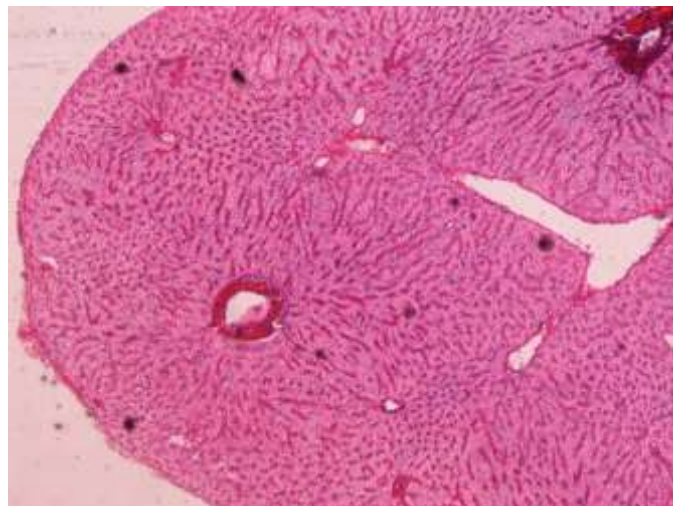
در بررسی مقاطع بافتی، ضایعات آسیب شناسی غیر اختصاصی به طور عمده شامل پرخونی در کلیه، طحال و کبد ماهی فیتوفاگک مشاهده گردید (اشکال ۳-۳۵ تا ۳-۴۰).



شکل ۳-۳۶- بروز پرخونی در بافت کلیه فیتوفاگک (بزرگنمایی ۱۰۰x H&E)

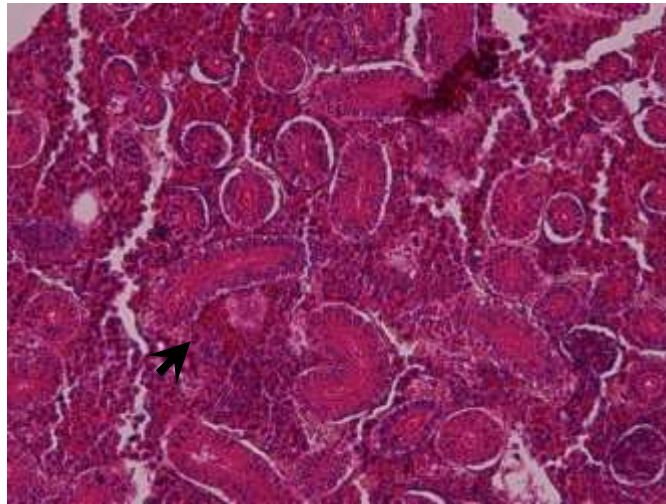


شکل ۳-۳۷- بروز پرخونی در بافت طحال فیتوفاگک (عدسی ۱۰x H&E)

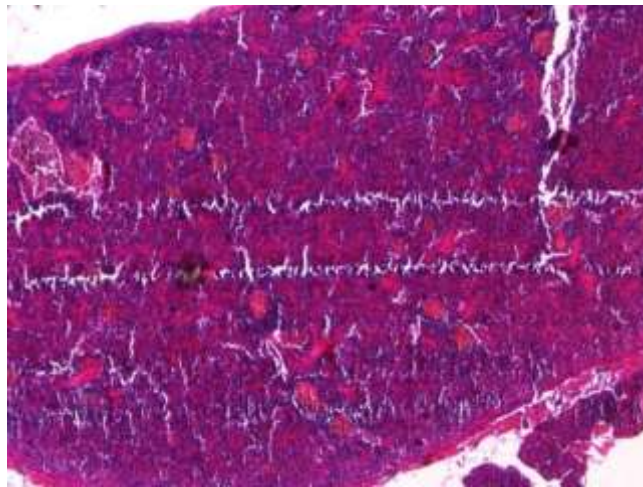


شکل ۳-۳۸- بروز پرخونی در بافت کبد فیتوفاگک (عدسی ۴x H&E)

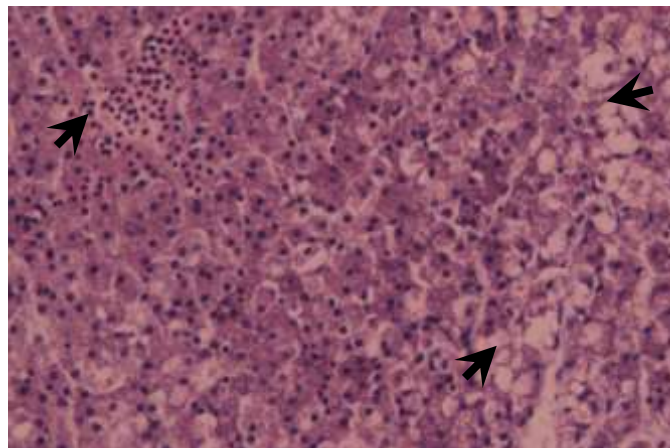




شکل ۳-۳۹- بروز پرخونی در بافت کلیه آمور (بزرگنمایی ۱۰۰x H&E)



شکل ۳-۴۰- بروز پرخونی در بافت طحال آمور (بزرگنمایی ۴۰x H&E)



شکل ۳-۴۱- بروز پرخونی و تغییرات دژنراتیو در بافت کبد آمور (بزرگنمایی ۴۰۰x H&E)

### ۳-۷- مطالعات بیماریزایی

این آزمایشات پس از تأیید تشخیص ویروس و جداسازی ویروس انجام می شود و به دلیل عدم جداسازی و تأیید ویروس در این تحقیق انجام نشد.

### ۳-۸- آزمایشات باکتری شناسی

در آزمایشات کشت و بیوشیمیایی ۲۱ جدایه آئروموناس هیدروفیلا تشخیص داده شدند که همگی همانند سویه استاندارد گرم منفی بودند و در خون گوسفند همولیز ایجاد کردند و در آزمایشات KOH، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، اندول، متیل رد (MR)، و گوس پرسکوئر (VP)، سیمون سترات، O/F، آرژینین دهیدرولاز، احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین و اسکولین مثبت بوده و قندهای گلوکز، مانوز، ترهالوز را مصرف نمودند و در نمک (NaCl) ۱ و ۴٪ رشد نموده اند ولی در آزمایشهای تولید SH<sub>2</sub>، اورنیتین دکربوکسیلاز، مصرف گزیلوز و هیدرولیز اوره منفی بوده و در NaCl ۶٪ رشد نکردند هم چنین به دیسک نوویوسین هم مقاوم بودند. سایر آزمایشات با سویه استاندارد متفاوت بود.

در آزمایشات بیوشیمیایی ۱۱ سویه که فقط در روش بیوشیمیایی آئروموناس هیدروفیلا تشخیص داده شدند همانند سویه استاندارد گرم منفی بودند و در آزمایشات KOH، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، متیل رد (MR)، و گوس پرسکوئر (VP)، O/F، احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین مثبت بوده و قندهای گلوکز، ترهالوز را مصرف نمودند و در نمک (NaCl) ۱ و ۴٪ رشد نموده اند ولی در آزمایش های تولید SH<sub>2</sub>، اورنیتین دکربوکسیلاز، مصرف گزیلوز و هیدرولیز اوره منفی بوده و در NaCl ۶٪ رشد نکردند هم چنین به دیسک نوویوسین هم مقاوم بودند. سایر آزمایشات با سویه استاندارد متفاوت بود.

۶ جدایه بر روی محیط آگار خوندار کلونی های P. fluorescens برنگ خاکستری روشن، ۱/۵ میلی متر و کلونی های P. aeruginosa برنگ خاکستری تیره بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد و همچنین باکتری کشت داده شده در محیط آگار خوندار، خون را بطور کامل مصرف کرده و به صورت همولیز بتا مشاهده گردید. تست اکسیداز و کاتالاز در همه جدایه ها مثبت و تنها ۳ باکتری P. aeruginosa در دمای ۴۲ °C رشد نمودند. همه جدایه های Pseudomonas در محیط GSP رشد نموده و رنگ بنفش ایجاد کردند. تمام ۹ جدایه بروی محیط Pseudomonas PFA رنگدانه زرد- سبز و در محیط Pseudomonas F agar و P agar رشد کرده ولی فقط ۳ جدایه در محیط PFA رنگدانه زرد- سبز و در محیط PPA رنگدانه آبی - سبز ایجاد کردند و سایر جدایه ها هیچگونه رنگدانه ای تولید نکردند. نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده بر روی جدایه های Pseudomonas در محیط TSI به صورت Aik/Aik، آبی شدن محیط سیمون سترات، اکسیداتیو بودن در محیط o، عدم تخمیر در محیط F، سیاه شدن محیط اسکولین و وجود حرکت در SIM مشاهده گردید.



## ۴- بحث

این پژوهش به دنبال بروز تلفات ماهیان کپور نقره ای و به میزان کمتر کپور علفخوار پرورشی با علائم خونریزی های زیر جلدی و در پایه باله ها و آسیت در کارگاه‌های پرورش ماهیان گرمابی استان گیلان با هدف جداسازی و شناسایی علل احتمالی ویروسی از اندامهای داخلی کلیه، کبد و طحال ماهیان دارای علائم بالینی در مزارع دارای تلفات انجام شد. تلفات ماهیان مذکور به عنوان مشکل عمده پرورش دهندگان ماهیان گرمابی در سالهای اخیر بویژه در فصول بهار و تابستان در استان گیلان مطرح بوده و طبق آمار غیر رسمی شیلات گیلان میزان تلفات ماهیان فیتوفاگ در تابستان ۱۳۸۹ بیش از ۱۱۶۲ تن با ارزش ریالی بیش از بیست و سه میلیارد ریال بود که در سال ۱۳۹۱ ۴۰ میلیارد ریال تخمین زده شد. تولیدات جهانی ماهیان آب شیرین در سال ۲۰۱۱ بیش از ۴۷ میلیون تن گزارش شده که حدود ۵۰ درصد آن مربوط به کپور ماهیان می باشد (FAO, 2012). از این میان میزان تولید ماهیان گرم آبی پرورشی ایران در سال ۱۳۹۱ به بیش از ۱۵۴ هزار تن رسیده که سهم استان گیلان حدود ۳۹ هزار تن می باشد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۲).

تلفات ماهی فیتوفاگ، به عنوان حساس‌ترین گونه ماهیان گرمابی، با گرم شدن هوا در اواخر خرداد و اوایل تیر آغاز می شود و در اواسط مرداد ماه که دما به شدت بالا می رود تلفات سه گونه دیگر نیز قابل مشاهده است اما بیشترین میزان تلفات مربوط به ماهی فیتوفاگ می باشد.

علائم بیماری ویرمی بهاره کپور شامل تیرگی رنگ، بیرون زدگی چشم، خونریزی پوست و پایه باله ها و محوطه شکمی است. در کالبدگشایی هم آب آوردگی محوطه شکمی و بیرون زدگی مخرج مشاهده می شود (OIE, 2012). در این تحقیق نیز علائم بالینی شامل خونریزی های زیر جلدی در پهلوها، پایه باله ها یا در کل باله و قرمز شدن زیر شکم و روی سرپوش آبششی، آگزوفتالمی خفیف، خونابه در محوطه شکمی (به رنگ های زرد، شفاف یا قرمز) و خونریزی های نقطه ای بر روی امعاء و احشاء و بیحالی در ماهیان فیتوفاگ و در برخی موارد زرد یا کمرنگ شدن کامل پوست مشاهده شد. این علائم بسیار شبیه علائم بالینی بیماری ویرمی بهاره بود اما از طرفی علائم بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی شامل افزایش ترشحات پوستی، بی حالی، بیرون زدگی حلقه چشم، بی اشتها و جمع شدن در ورودی یا اطراف هواده می باشد (Rahmati-holasoo و همکاران، ۲۰۱۶) که در بسیاری از ماهیان کپور نقره ای مورد بررسی مشهود بود.

علائم بالینی عفونت رئوویروسی آمور شامل خونریزی عمومی در اندامها و خونریزی کانونی یا نقطه ای در اندامها، عضلات اسکلتی، کبد، طحال و کلیه به همراه بیرون زدگی چشم، تیرگی رنگ، خونریزی پایه باله ها، کمرنگی آبشش است اما در تعداد کمی از ماهیان آمور علائم خونریزی های نقطه ای پوست و احشاء و آسیت (آب آوردگی) در محوطه شکمی مشاهده شد. در موارد معدودی حالت تورم و پختگی در عضلات ماهی فیتوفاگ دیده شد. در خصوص بچه ماهیان موارد متعددی از لاغری مفرط مشاهده شد.

مجموعه علائم مشاهده شده و شدت تلفات در ماهیان گرمابی استان گیلان احتمال وجود بیماری های ویروسی مانند ویرمی بهاره کپور، بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی و بیماری رئوویروسی ماهی آمور را افزایش داد. که بیماری های ویرمی بهاره کپور و بیماری هرپس ویروسی ماهی کوی در این لیست بیماری های اخطار کردنی قرار دارند (OIE, 2012). اما تفاوت در علائم بالینی می تواند نشانگر وجود علل متفاوت تلفات در مزارع مختلف باشد. این مساله با توجه به تاثیر متفاوت اقدامات بهداشتی در کاهش تلفات شامل مدیریت آب و تعویض آب استخر، آهک پاشی و استفاده از آنزیمیت می تواند تایید گردد به طوری که در برخی مزارع اقدامات بهداشتی انجام شده توسط پرورش دهنده منجر به کاهش یا قطع تلفات می گردید اما در برخی دیگر علی رغم مدیریت بهداشتی انجام شده توسط پرورش دهنده تلفات ادامه می یافت.

Fijan در سال ۱۹۸۸ نشان داد که مسیر عمده سرایت SVCV به صورت انتقال افقی بوده و سرایت عفونت می تواند از طریق ماهی بیمار، آب آلوده و سایر حاملین زنده و غیر زنده صورت پذیرد. انتقال از طریق آبشش اصلی ترین مسیر سرایت این ویروس در ماهی کپور می باشد (Ahne, 1978) لذا در صورت وجود بیماری در فاز حاد و در شرایط متراکم به راحتی و به صورت افقی باید به سایر ماهیان استخر انتقال یابد و قابل جدا سازی از ماهیان دارای علائم باشد. بنابراین در تحقیق حاضر بیماری های SVC و KHV بر روی هر دو گونه فیتوفاگک و آمور به عنوان گونه های حساس آزمایش شدند.

بر اساس پیشنهاد سازمان OIE روش های مختلفی برای شناسایی ویروس ها ذکر شده که شامل کشت سلولی، RT-PCR، IFAT، NT و ELISA می باشد. لذا در این تحقیق پس از تلقیح هوموژن بافتی بر روی دو تیره سلولی EPC و BF2 نمونه ها به روش های RT-PCR و IFAT آزمایش شدند (OIE, 2012). به منظور جداسازی SVCV چندین تیره سلولی پیشنهاد گردیده اند، اما تیره های سلولی EPC و FHM به عنوان مناسب ترین و مؤثرترین تیره های سلولی جهت جداسازی SVCV توسط سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) پیشنهاد گردیده اند. کارایی این تیره های سلولی در تکثیر و جداسازی SVCV قبلاً توسط Ahne (1973) و Bjorklund و همکاران (1996) مورد بررسی قرار گرفته است.

در این مطالعه نیز تلقیح نمونه ها بر روی تیره های سلولی EPC و BF2 انجام شد و مراحل تایید تشخیص به کمک روش های آنتی بادی درخشان، RT-PCR و PCR صورت پذیرفت. روش های سرولوژیک همچون الیزا و آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم، از تست های تشخیصی رایج بوده و جهت تایید ماهیت ویروس جداسازی شده از ارزش و اهمیت بالایی برخوردارند. به این منظور پس از ایجاد آثار آسیب سلولی در سلول های EPC، این سلول ها با استفاده از آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. این روش بر پایه استفاده از آنتی بادی های اختصاصی علیه یک آنتی ژن یا چندین آنتی ژن مشابه می باشد. استفاده از این روش با استفاده از آنتی بادی علیه گلیکوپروتئین G، SVCV، تا کنون توسط Way (1991) و Rodak و همکاران (1993) گزارش گردیده است. اگر چه مواردی از واکنش های متقاطع بین آنتی بادی ضد

SVCV با سایر رابدو ویروس‌ها از جمله PFRV گزارش گردیده است (Ahne et al., 2002). در کشت سلولی، آثار آسیب سلولی (CPE) مشکوک به بیماری SVC پس از تلقیح هموژن بافتی ۳ ماهی فیتوفاگ بر روی تک لایه سلولی آثار تخریب سلولی مشکوک به CPE بدست آمد ولی در پاساژهای بعدی علایم آسیب سلولی ایجاد نگردید که احتمالاً آثار سمی ناشی از غلظت بالای مواد و ترکیبات موجود در هموژن بافتی تلقیح شده بود و در پاساژهای بعدی میزان و تاثیر آن کاهش یافت. در خصوص نمونه های آمور نیز هیچگونه آثار آسیب سلولی بر روی دو تیره سلولی EPC و BF2 ایجاد نشد. در آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم نیز که ۷۲ ساعت پس از تلقیح هموژن بافتی ماهی فیتوفاگ و آمور بر روی تک لایه سلولی EPC انجام شد، هیچگونه واکنشی مشاهده نگردید. در روش PCR و RT-PCR تمام نمونه های فیتوفاگ و آمور از نظر بیماری های SVC و KHV و نمونه های آمور از نظر وجود بیماری GCRV با استفاده از جفت پرایمر های اختصاصی آزمایش شدند. بعلاوه به طور همزمان از کیت های تجاری تشخیص SVC و KHV (IQ2000) استفاده شد. نتایج تمام آزمایشات PCR و RT-PCR حاکی از عدم وجود RNA رابدو ویروس کاریبو، رئوویروس و DNA هرپس ویروس کوی در نمونه های مورد آزمایش بود. به این ترتیب که در PCR دستی باند ۴۷۰ bp مربوط به SVCV، باند ۲۹۲ bp و باندهای ۶۹۷ bp و ۳۲۰ bp مربوط به GCRV در هیچیک از نمونه ها تایید نشد و به همین صورت در الکتروفورز محصول PCR مربوط به کیت های IQ2000 به ترتیب باندهای منفی ۴۷۱ bp و ۶۴۰ bp مشاهده شد و باندهای مثبت ایجاد نگردید. به منظور تایید نتایج، ۳ نمونه مشکوک به آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا ارسال گردید که هیچیک از بیماری های مذکور تایید نشد. به طور همزمان بر روی نمونه های ۲۶ مزرعه آزمایش تشخیص عوامل باکتریایی با کشت از بافت های کلیه و طحال بر روی آگار خوندار انجام شد. در آزمایشات کشت و بیوشیمیایی ۲۱ جدایه آئروموناس هیدروفیلا و ۶ جدایه جنس سودوموناس تشخیص داده شد در حالیکه از همان نمونه ها هیچگونه ویروسی تایید نگردید. شیوع بیماری ناشی از آئروموناس های متحرک در کشور چین به عنوان بزرگترین تولید کننده ماهیان گرمابی جهان به ویژه در فصل تابستان معمول بوده (Qian و همکاران، ۱۹۹۵) و وابسته به عوامل استرس زا مانند آلودگی های انگلی شدید (Nie و Yao، ۲۰۰۰)، دمای بالای آب و اکسیژن پایین می باشد. آئروموناس هیدروفیلا به عنوان یک گونه غالب از آئروموناس های متحرک از ماهیان بیمار با سپتی سمی هموراژیک بارها در کشور چین گزارش شده است (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱). شکوفایی جلبکی نیز به کاهش کیفیت آب کمک نموده و یک پارامتر اساسی برای ضعف سیستم ایمنی و در نتیجه تهاجم عوامل فرصت طلب از جمله باکتری ها به اندام های داخلی ماهیان می باشد. آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل بیماریزا، در آب های دارای بار مواد آلی بالا، بیشتر یافت می شود (Farber و همکاران، ۱۹۹۶). در آب استخرهای پرورش ماهیان گرمابی در استان گیلان نیز به دلیل استفاده از کودهای حیوانی و شیمیایی سطح بالایی از مواد آلی وجود دارد که موجب تغییرات pH می گردد و از آنجایی که آئروموناس هیدروفیلا فلور طبیعی این گونه محیط ها می باشد ماهی ها بطور مداوم در معرض عفونت قرار دارند. برخی محققین ایرانی نیز به نقش اولیه فاکتورهای محیطی

مانند فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، کوددهی زیاد، جلبک های سمی در ایجاد تلفات تأکید نمودند (غواص، ۱۳۸۱). علیشاهی، ۱۳۸۷، شکوفایی پلانکتونی و کوددهی بالا را علت اصلی تلفات ماهی آمور و فیتوفاگ عنوان نمود. شیوع بیماری در استان گیلان عمدتاً در فصل بهار و تابستان بوده که دمای آب به شدت بالا رفته و به دلیل کمبود منابع آبی امکان تعویض مناسب آب به مدت طولانی وجود ندارد لذا شرایط محیطی جهت بروز عفونت باکتریایی مناسب است. در سپتی سمی های ناشی از آئروموناس های متحرک و غیر متحرک علائم کلینیکی مشابهی ایجاد می گردد که شبیه سایر عفونت های باکتریایی و ویروسی می باشد (Austin and Austin، ۲۰۰۷). خانواده سودوموناداسه (Pseudomonadaceae) نیز به میزان وسیعی در محیط های خاکی و آبی پراکنده اند و ممکن است که پاتوژن های فرصت طلب برای انسان، جانوران و گیاهان باشند (Sujatha et al., 2011).

در تحقیق حاضر افزایش میزان تلفات با افزایش دما ارتباط مستقیم داشت اما با توجه به بالا بودن میانگین درجه حرارت آب در اوج تلفات و حساسیت عوامل ویروسی ماهیان به حداکثر دمای ثبت شده (میانگین دمای آب، اکسیژن و pH در مزارع به ترتیب  $31-26/5$  °C،  $4/3-5/7$  mg/L و  $7/4-9/38$ ) و عدم تایید و تشخیص عوامل ویروسی به نظر می رسد علت تلفات در دمای بالای تابستان مربوط به عوامل ویروسی نبوده و در هریک از مزارع با توجه به شرایط عمومی و مدیریت پرورش متفاوت می باشد. در بسیاری از مزارع، تلفات فقط به دلیل عدم آماده سازی مناسب استخر پیش از شروع پرورش بوده و با وجود رسوبات آلی فراوان و تولید گاز در ماههای گرم موجب خفگی یا مرگ تدریجی ماهیان گردیده است و هیچگونه عامل عفونی جدا نگردید. همچنین در برخی مزارع به دلیل شفافیت بیش از حد آب و غنای کم آن و در نتیجه گرسنگی ماهی فیتوفاگ و به دنبال آن کاهش رشد و ضعف سیستم ایمنی و غلبه عوامل باکتریایی و قارچی فرصت طلب مرگ اتفاق می افتاد. در برخی مزارع با pH بالای ۹ نیز علائم خونریزی شدید پوست، پرخونی آبشش و حالت تورم و پختگی عضلانی مشاهده شد که از این موارد نیز عامل ویروسی جدا نشد.

بر اساس نتایج کشت بر روی دو تیره سلولی و آزمایشات PCR، RT-PCR و IFAT حضور عوامل ویروسی SVC، KHV و GCRV در نمونه های مورد آزمایش در این تحقیق تایید نگردید و علت تلفات در بسیاری از مزارع مربوط به عوامل ویروسی نبوده و در بسیاری از موارد با مدیریت بهداشتی مزارع قابل کنترل و پیشگیری می باشد.

### پیشنهادها

- مطالعه بیماری‌های ویروسی در ماهی کپور پرورشی استان گیلان به عنوان گونه میزبان اصلی
- مطالعات میدانی جهت شناسایی جمعیت ماهیان حامل ویروس و حاملین پلاتکتونی احتمالی
- مطالعه بیماری‌های ویروسی در ماهیان زینتی وارداتی

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران محترم بخش بهداشت و بیماری های آبزیان پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی کشور و موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و سایر همکاران پروژه که از کمک های فکری و عملی ایشان بهره مند گردیدم صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

## منابع

- ۱- آذری تاکامی م.، ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روش‌های پیشگیری و درمان بیماری‌های ماهی. تبریز: انتشارات پرپور، ۳۰۴ صفحه.
- ۲- پیغان ر.، مشائی م.، ۱۳۸۴. مدیریت مزارع پرورش ماهی گرمابی. بهداشت و تغذیه ماهیها. تهران: انتشار دریا سر، ۲۶۴ صفحه.
- ۳- خوش خلق، م.، ۱۳۸۴. تکثیر و پرورش و سایر ماهیان پرورشی (ترجمه)، انتشارات دانشگاه گیلان، ۲۵۰ صفحه.
- ۴- سالنامه آماري شيلات ايران ۱۳۹۱-۱۳۸۱ (سال انتشار ۱۳۹۲)، روابط عمومی شيلات ايران. ۶۴ ص.
- ۵- سلطانی م، ۱۳۷۶. بیماریهای آزاد ماهیان. تهران: انتشارات دانشگاه، ۴۴۴ صفحه.
- ۶- علیشاهی م، مصباح م، نجف زاده ورزی ح، خواجه غ. ۱۳۸۷. اثر اکیناسه پورپورا در مقاومت در برابر عفونت با *Aeromonas hydrophila* در کپور علفخوار *idella*. اولین کنگره بین المللی بهداشت و بیماریهای آبزیان. صفحه ۸۲-۸۲.
- ۷- غواص علی ۱۳۸۱. بررسی دلیل تلفات ماهی آمور و فیتوفاگک در استان گیلان. دومین کنگره ملی بهداشت و بیماریهای آبزیان، اردیبهشت ۱۳۸۲. صفحه ۲۷.
- ۸- مخیر ب.، ۱۳۸۹. بیماری‌های ماهیان پرورشی. تهران: انتشارات دانشگاه، صفحه ۳۵۰.
- 9- Ahne W (1978). Uptake and multiplication of spring viraemia of carp virus in carp, *Cyprinus carpio*. L. Journal of Fish Diseases, 1: 265-268.
- 10- Ahne. W. (1986). Unterschiedliche biologische Eigenschaften 4 cyprinidenpathogener Rhabdovirusisolate. Journal of Veterinary Medicine. B, 33, 253-259.
- 11- Ahne W., Kolbl O. (1987). Occurrence of reovirus in European cyprinid fishes (*Tinca tinca* Lin., *Leuciscus cephalus* Lin.) Journal of Applied Ichthyology 3:139-141.
- 12- Ahne W, Kurath G, Winton JR (1998). A ribonuclease protection assay can distinguish SVCV from PFR. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 6: 220-224.
- 13- Ahne, W.; Bjorklund, H.V.; Essbauer, S.; Fijan, N.; Kurath, G.; Winton, J.R. (2002). Spring viremia of carp (SVC Disease of Aquatic Organisms, 52, 261-272.
- 14- Al-Hussinee, L.; Lord, S.; Stevenson, R.M.; Casey, R.N.; Grocock, G.H.; Britt, K.L.; Kohler, K.H.; Wooster, G.A.; Getchell, R.G.; Bowser, P.R.; et al. (2011) Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. Disease of Aquatic Organisms, 93, 117-127.
- 15- Anonymous. (2003). Herpes virus kills 860 tons of carp. The Japan Times, Online. November 3, 2003. <http://www.japantimes.co.jp/cgi-bin/getarticle.pl5?nn20031103a8.htm>
- 16- Arshaniza NM, Bauer ON, Vladimirov VL (1968). Air bladder disease of carps: its aetiology, epizootiology and control. BULLETIN de l'OFFICE INTERNATIONAL des ÉPIZOOTIES 69:999-1006.
- 17- Austin, B. and AL-Zahrani. A. M. J. 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout *Salmo gairdner* Richardson. Journal of Fish Biology. 33:7-14.
- 18- Basic A, Schachner O, Bilic I and Hess M (2009). Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. Diseases of Aquatic Organisms, 85: 31-40.
- 19- Bjorklund HV, Emmenegger EJ, Kurath G (1995) Comparison of the polymerases (L genes) of spring viremia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus. Vet Res 26:394-398
- 20- Bjorklund HV, Higman KH, Kurath G (1996) The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. Virus Res 42:65-80.

- 21- Bootland, L.M.; Leong, J.C. Infectious haematopoietic necrosis virus. In *Fish Diseases and Disorders*; Woo, P.T.K., Bruno, D.W., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1999; Volume 3, pp. 57–121.
- 22- Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* .19: 21-41.
- 23- Chen Y., Jiang Y. (1983). Studies on the morphological and physico-chemical characterization of the hemorrhagic virus of grass carp. *KeXue TongBao (Foreign Lang Edn)* 28:1138–1140.
- 24- Chen, Z.Y; Liu, H.; Li, Z.Q and Zhang, Q.Y (2008) Development and characterization of monoclonal antibodies to Spring Viraemia of Carp Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123, 266-276.
- 25- Dikkeboom A.L., Radi C., Toohey-Kurth K., Marcquenski S., Engel M., Goodwin A.E., Way K., Stone D.M. & Longshaw C. (2004) First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in North America. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 169–178.
- 26- Ding Q., Yu L., Wang X., Ke L. (1991). Study on infecting other fishes with grass carp hemorrhagic virus. *Chin J Virol* 6(4):371–373.
- 27- Dixon P F (2008). Virus diseases of cyprinids. In: *Fish Diseases*, Vol. 1. Eiras, J. C., Segner, H., Wahli, T. and Kapoor, B. G. eds. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 87–184.
- 28- Emmenegger E.J. and Kurat G. (2008). DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 26, 6415–6421.
- 29- Fang Q., Attoui H., Biagini J. F., Zhu Z., de Micco P., de Lamballerie X. (2000) .Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the grass carp reovirus (Genus aquareovirus, family reoviridae). *Biochem Biophys Res Commun* 274(3):762–766.
- 30- FAO.(2012 ). The state of world fisheries and aquaculture 2012 . FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. 197 p
- 31- Faisal M, Ahne W (1990) A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear cells of a normal common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev Comp Immunol* 14:255–260.
- 32- Fijan N, Petrinc Z, Sulimanović O, Zwillenberg LO (1971) Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Veterinarski arhiv journal*. 41:125–138.
- 33- Fijan N, Sulimanović O, Bearzotti M, Mušinić D, Zwillenberg LO, Chilmonec S, Vautherot JF, de Kinkelin P (1983) Some properties of the epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de Institut Pasteur / Virologie*, 134E:207–220.
- 34- Fijan N, Matasin S (1980) Spring viraemia of carp: preliminary experiments on vaccination by exposure to virus in water. *Veterinarski arhiv journal* 50:215–220.
- 35- Fijan N (1988) Vaccination against SVCV. In: Ellis AE (ed) *Fish vaccination*. Academic Press, London, p 204–215.
- 36- Fijan N (1999) Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders*, Vol 3. CAB International, Oxon, p 177–244.
- 37- Fu, Z.F (2005) Genetic comparison of the rhabdoviruses from animals and plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 292, 1–24.
- 38- Garver KA, Dwilow AG, Richard J, Booth TF, Beniac DR and Souter BW (2007). First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio L.*, from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. *Journal of Fish Diseases*, 30: 665–671.
- 39- Goodwin A.E., Dikkeboom A., Radi C., Kurath K., Marcquenski S., Way K. & Stone D.M. (2002) 4th International Symposium for Aquatic Animal Health of the Fish Health Section of the American Society. 1–6 September 2002. New Orleans, Louisiana, USA.
- 40- Goodwin A.E (2009) Spring Viremia of Carp Virus (SVCV): Global Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research. *International Journal of Aquaculture-Bamidgheh* 62(3), 180-187.
- 41- Haenen O.L.M., Way K., Bergmann S.M. & Areil E. (2004) The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24, 293–307.
- 42- Hatai, K., Egussa, S., Nakajima, M. & Chikahata, H. 1975. *P. chlororaphis as a fish Pathogen*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 41. 7-1203.
- 43- Haghighi Kiabani A., Bandehpour M., Sharifnia Z. & Kazemi B.(2008). The first report of spring viremia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. *Asian journal of animal and veterinary advances* 3(4): 263-268.
- 44- Hill BJ, Underwood BO, Smale CJ, Brown F (1975) Physicochemical and serological characterization of 5 rhabdoviruses infecting fish. *J Gen Virol* 27:369–378.
- 45- Hoffmann B, Schutz H, Mettenleiter T (2002) Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of spring viremia of carp, a fish rhabdovirus. *Virus Res* 84:89–100.



- 46- Jørgensen PEV, Olesen NJ, Ahne W, Lorenzen N (1989) SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses. In: Ahne W, Kurstak E (eds) *Viruses of lower vertebrates*. Springer Verlag, Heidelberg, p 349–366.
- 47- Kim H.J. (2012). Improved diagnosis of spring viremia of carp by nested reverse transcription PCR: Development of a chimeric positive control for prevention of false-positive diagnosis. *Journal of virological methods.*, 185: 39-42.
- 48- Kiryu I., Sakai T., Kurita J. and Iida T. (2007). Virucidal effect of disinfectants on spring viremia of carp virus. *Fish Pathol.*, 42, 111–113.
- 49- Kiuchi A, Roy P (1984) Comparison of the primary sequence of spring viremia of carp virus M protein with that of vesicular stomatitis virus. *Virology* 134:238–243.
- 50- Koutna. M, Vesely T, Psikal I, Hulova J (2003). Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 229-235.
- 51- Kumaran, S., Deivasigamani, B., Alagappan, K.M., Sakthivel, M., Guru Prasad, S. 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KUMS3 from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) with fin rot *World J Microbiol Biotechnol.* 26:359–363.
- 52- Liu H., Gao L., Shi X., Gu T., Jiang Y. & Chen H. (2004) Isolation of spring of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in P.R. China. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24, 194–198.
- 53- Lorenzen, N.; Olesen, N. (1997) Immunization with viral antigens: Viral haemorrhagic septicaemia. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 201–209.
- 54- Lupiani B., Reddy S.M., Samal S.K. (1997). Sequence analysis of genome segment 10 encoding the major outer capsid protein (VP7) of genogroup B aquareovirus and its relationship with the VP7 protein of genogroup A aquareovirus. *Arch Virol* 142(12):2547–2552.
- 55- McLoughlin, M. (2006) Fish vaccination – A brief overview. <<http://www.imb.ie/images/uploaded/documents/Fish%20Vaccine%20Overview.pdf>> (Published January 25, 2006; Consulted February 27, 2012).
- 56- Mork, C.; Hershberger, P.; Kocan, R.; Batts, W.; Winton, J. (2004) Isolation and characterization of a rhabdovirus from starry flounder (*Platichthys stellatus*) collected from the northern portion of Puget Sound, Washington, USA. *J. Gen. Virol.*, 85, 495–505.
- 57- Office International des Epizooties (OIE) (2012). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Spring viraemia of carp. Chapter 2.3.8. pp. 257-273.
- 58- Office International des Epizooties (OIE) (2013). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Koi herpes viral disease. Chapter 2.3.6. pp. 328-344.
- 59- Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). (2001). *Koi Herpes Virus (KHV)*. OATA, Westbury, Wilts, UK. Pp. 4-33.
- 60- Osadchaya EF (1964) Isolation of cytopathogenic agents from carp in the acute form of infectious dropsy of carp. *Veterinarya (Mosc)* 41:29.
- 61- Palleroni et al., 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23:9-333.
- 62- Plumb J.A., Bowser P.R., Grizzle J.M., Mitchell A.J. (1979). Fish viruses: a double-stranded RNA icosahedral virus from a North American cyprinid. *J Fish Res Board Can* 36: 1390–1394.
- 63- Pokorova D., Piackova V., Cizek A., Reschova S., Hulova J., Vicenova M., Vesely T. (2007). Tests for the presence of Koi herpes virus (KHV) in common carp (*Cyprinus carpio carpio*) and Koi carp (*Cyprinus carpio koi*) in the Czech Republic. *Veterinary medicine* 52: 562-568.
- 64- Purcell M.K, Laing K.J and Winton. J.R (2012). Immunity to Fish Rhabdoviruses. *Viruses*, 4, 140-166.
- 65- Rahmati-Holasoo H, Zargar A, Ahmadvand S, Shokrpour S, Ezhari S, Ebrahimzadeh Mousavi HA. 2016. First detection of koi herpesvirus from koi, *Cyprinus carpio* L. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study. *Journal of Fish Disease*. 39(10):1153-63.
- 66- Rodak L, Pospisil Z, Tomanek J, Vesely T, Obr T and Valicek L (1993). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio*. L. *Journal of Fish Diseases*, 16: 101-111.
- 67- Roy P, Clewley JP (1978) Spring viremia of carp RNA and virion-associated transcriptase activity. *J Virol* 25:912–916.
- 68- Roy P (1981) Phosphoproteins of spring viremia of carp virus. *Virology* 112:274–281.
- 69- Sanders GE, Batts WN, Winton JR (2003). Susceptibility of Zebrafish (*Danio rerio*) to a Model Pathogen, Spring Viraemia of Carp Virus. *Comparative Medicine*, 53(5): 514-521.

- 70- Sano M., Ito T., Kurita J., Yanai T., Watanabe N., Satoshi M. & Iida T. (2004) First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathology* 39, 165–168.
- 71- Schrek, C. B., Moyle, P. B., 1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. 648.
- 72- Siwicki, A.K. (2003) Influence of Methisoprinol on the replication of rhabdoviruses isolated from carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus melas*): in vitro study. *Polish J. Vet. Sci.* 6, 47–50.
- 73- Sujatha, K., Senthilkumar, P., Sangeetha, S. and Gopalakrishnan, M.D. 2011. Isolation of human pathogenic bacteria in two edible fishes, *Priacanthus hamrur* and *Megalaspis cordyla* at Royapuram waters of Chennai, India. *Indian Journal of Science and Technology*. 4 (5):539-541.
- 74- Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T., Sheppard A.M., Taylor G.R. & Way K. (2003) Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, 203–210.
- 75- Teng Y., Liu H., Lu J.Q., Fan W.H., Zhang Q.Y. & Qin Q.W. (2007) Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Archives of Virology* 152, 1457– 1465.
- 76- Tesarsik J, Macura B (1981) Field carp vaccination against spring viremia on the fish farms of the State Fishery. *Pr VURH Vodnany (in Czech)* 17:3–11
- 77- Tomasec I, Brundnjak Z, Fijan N, Kunst L (1964) Weiterer Beitrag zur Ätiologie der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens. *Bull Int Jugoslavenska Akademija Znanosti Umjetnosti Zagreb* 16:35–44.
- 78- Trust, T.J. and Sparrow, R. A. H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Canadian Journal of Microbiology*. 20:28-1219.
- 79- Varner P.W., Lewis D.H. (1991). Characterization of a virus associated with head and lateral line erosion syndrome in marine angel fish. *J Aquat Anim Health* 3:198–205.
- 80- Walker PJ, Benmansour A, Calisher CH, Dietzgen R et al (2000) Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others (eds) *The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA, p 563–583.
- 81- Waltzek T.B., Kelley G.O., Yun S.C., McDowell T.S., Hedrick R.P. (2004). Relationships of Koi Herpesvirus (KHV) to Herpes-like Viruses of Fish and Amphibians. In: *Proceedings, 35th Annual Conference, International Association for Aquatic Animal Medicine*, Galveston, TX 35: 16-17.
- 82- Warg. J.V. Dikkeboom. A.L. Goodwin. A.E. Snekvik. K. Whitney. J. (2007) Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes* 35:87–95.
- 83- Way K (1991). Rapid detection of SVC virus antigen in infected cell cultures and clinically diseased carp by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J.appl.Ichthyol.*, 7: 95-107.
- 84- Whitfield, A.E.; Calisher, C.H.; Stone, D.M.; Kurath, G.; Kuzmin, I.V.; Rodriguez, L.L.; Tordo, N.; Walker, P.J.; Dietzgen, R.G.; Tesh, R.B.; et al. Rhabdoviridae. In *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King, M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2011; pp. 686–714.
- 85- Winton J.R., Lannan C.N., Fryer J.L., Hedrick R.P., Meyers T.R., Plumb J.A., Yamamoto T. (1987). Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reovirus isolated from aquatic animals. *J Gen Virol* 68: 353–364.
- 86- Winton, J.R. (1997) Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 211–220.
- 87- Wolf K. (1988). *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY. Pp. 191-216, 253-263.
- 88- Wu JG, Kiuchi A, Roy P (1987) Intergenic sequences and gene-order (NMG) of SVCV. In: Mahy BWJ, Kolakofsky D. eds. *The biology of negative strand viruses*. Elsevier, Amsterdam, p 221–226.

**Abstract:**

Warm water aquaculture development along with import of eyed eggs, Broodstocks and ornamental fish also transferring of fingerlings and broodstocks from one province to another one has led to spreading of some unwanted diseases.

According to the Gilan Fisheries Department report, mortality rate of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the summer of 2010 caused losing of silver carp production more than 1162 tons which was valued over than twenty-three million rials that was increased to about 40 million rials in 1391.

Also grass carp had a less mortality rate in some farms. Observed symptoms and severity of losses increased the probability of viral diseases such as spring viremia of carp, koi herpes virus and grass carp reovirus. In this research, totally 411 silver carp and grass carp with 5 to 2300 gram weight from 83 farms were sampled during 2011-2012.

Clinical symptoms was different in various farms and subcutaneous hemorrhages on the flanks, red fin base or total fin and Red belly and operculum, mild exophthalmia, hemorrhaging in the abdominal cavity (yellow, transparent or red fluid) and petechial haemorrhages of skin and viscera and Ascites in abdominal cavity and some silver carps and grass carps were observed with palied liver and gill.

In some cases swelling muscle was observed in Silver carp. Several fries with the severe emaciation were observed. Difference between clinical symptoms can indicate the presence of different causes of mortality in different farms. Various water colors from completely transparent to dark green, yellow or slightly brown observed in different pool, which shows the difference in overall culture management including water quality management. The minimum Water turbidity using secchi disk was 40 centimeters to one meter page in the fields. Source semi-deep wells or deep pools that were used as water source. Average water temperature, oxygen and pH in fields 26/5-31 °C, 4/3-5/7 mg/L and 7/4-9/38. In order to virological surveys, sampling of internal organs, including kidneys, and spleen were done. Homogeneous target tissues after spending 0/45 micron filter on EPC and BF2 cell line were inoculated to observe cell damage (CPE) in case of confirmation of antibody detection methods brilliant, RT-PCR and PCR done.

In cell culture examination, a kind of cell damage (CPE-like changes) was observed after inoculating of 3 samples of Silver carp those were suspected to SVC, but in the second and third passages there were no sign of cell damage.

It may be because of toxic effect of tissue filtrate on the cell monolayer. Concerning sample of Grass carp on two EPC and BF2 cells no evidence of cell damage was found.

In indirect fluorescent antibody test, 72 hours after inoculation of tissues filtrates of silver carp and grass carp samples on EPC, no positive reaction was observed. PCR and RT-PCR tests using specific primer pairs were done to test all of the silver carp and grass carp samples for SVC and KHV diseases Also for GCRV in grass carp samples.

In addition, simultaneously commercial PCR kits applied for testing of SVC and KHV (IQ2000, Taiwan). The results of PCR and RT-PCR tests showed no evidence of robdovirus Carpio and grass carp reovirus RNA and no sign of koi herpesvirus DNA in tested samples.

In conventional PCR and RT-PCR tests Using specific primer pairs none of positive bands related to SVCV (470 bp) and GCRV (292bp, 697bp and 320bp) were not confirmed in the tested samples. Also in electrophoresis of PCR products using IQ2000 kit revealed 471 bp and 640 bp negative bands in all samples and the positive bands were not observed.

For confirmation of the results, three suspected samples were sent to Europe Union Reference Laboratory and none of mentioned diseases were confirmed. Simultaneously bacteriological examination applied for 26 using blood agar. In bacterial culture and related analyzes 6 isolates of *Pseudomonas* and 21 isolates of *Aeromonas hydrophila* were detected from 26 farms while no virus was confirmed in the same samples.

Based on the results of cell culture, PCR, RT-PCR and IFAT tests no one of SVCV, KHV and GCRV viruses were confirmed in tested samples. Therefore, the etiological reason of the mortalities in the tested farms was not viral diseases and should be prevent and control by biosecurity and health management in the farms.

**Keywords:** SVCV, KHV, GCRV, Silver carp, grass carp



**Ministry of Jihad – e – Agriculture  
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION  
Iranian Fisheries Science Research Institute – Inland Waters Aquaculture Research  
Center**

---

**Project title: Investigation on probable Viral Agents associated with grass carp and silver carp mortality in Gilan province**

**Approved Number: 2-73-12-96168**

**Author: Mohaddes Ghasemi**

**Project researcher: Mohaddes Ghasemi**

**Collaborator(s): I. Sharifpor, J. Zorriehzahra, M. Sharifroohani, Sh. Kakoolaki, M. Moradi, Sh. Behmanesh, S. Dajandian, J. Daghigh rohi, S. Haghighikarseidani, B. Ramazani aghelah, H. Nezamabadi, M. Faeed, M. Ahmadnejad, M. Asgharnis, M. Amini, A. Sepahdari, J. Najafi, F. Chakmedooz, A.R. Afraz, A. Noori**

**Advisor(s): -**

**Supervisor: -**

**Location of execution: Guilan province**

**Date of Beginning : 2011**

**Period of execution : 2Years**

***Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute***

***Date of publishing: 2017***

**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 Science Research Institute -Inland Waters Aquaculture Research  
Center**

**Project Title :**

**Investigation on probable Viral Agents associated with  
grass carp and silver carp mortality in Gilan province**

**Project Researcher:**

*Mohaddes Ghasemi*

**Register NO.**

**52124**