جداسازی و شناسایی رابدوویروس عامل ویرمی بهاره کپور از ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) پس از مواجه سازی گوارشی و انتقال افقی

حجت‌اله زمانی[۱]
محدث قاسمی[۲*]
سید مسعود حسینی[۳]
سمیه حقیقی کارسیدانی[۴]

۱، ۳. دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران
۲. پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، بندر انزلی، ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندر انزلی، گروه شیلات، بندرانزلی، ایران

***مسئول مکاتبات:**
mohades@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۳
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی می‌باشد.

چکیده

بیماری ویرمی بهاره کپور ماهیان یک عفونت رابدوویروسی است که باعث خونریزی حاد و ویرمی واگیردار در گونه‌های مختلف خانواده کپورماهیان می‌شود. در این مطالعه میزان حساسیت ماهی سفید دریای خزر به ویروس عامل این بیماری بررسی گردید. در این مدل تجربی، ۹۰ قطعه بچه ماهی سفید به طور تصادفی به شش گروه مساوی در دو دسته سه تایی (۳-۱) A و (۳-۱) B تقسیم شدند که به صورت دو تیمار انتقال افقی و گوارشی با دو تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور مواجه‌سازی به روش انتقال افقی، سه قطعه ماهی سفید که قبلاً به شیوه تزریق داخل صفاقی با محلول حاوی ویروس آلوده شده بودند، به هر آکواریوم اضافه شدند. برای مواجه‌سازی گوارشی، ماهیان با گرانول‌های غذایی آغشته به محلول حاوی ویروس تغذیه شده و به آکواریوم‌های مربوطه منتقل گردیدند. ماهیان به مدت شش هفته از نظر بروز تغییرات رفتاری و علائم بالینی بررسی شده و در صورت بروز علائم بالینی و تلفات، بلافاصله جهت آزمایش‌های ویروس‌شناسی و آزمایش مولکولی (RT-PCR) نمونه‌برداری شدند. همچنین، در پایان دوران مواجه‌سازی از ماهیان زنده نمونه‌برداری صورت گرفت. جداسازی ویروس با تلقیح هوموژن بافتی ماهیان بیمار به سلول‌های تیره EPC انجام شد و تشخیص ویروس به روش آنتی بادی درخشان غیرمستقیم صورت گرفت. بر اساس نتایج، مواجه سازی به روش انتقال افقی منجر به ۵۷ درصد و مواجه سازی گوارشی منجر به ۱۰ درصد تلفات گردید. آزمایش RT-PCR بر روی بافت ماهیان تلف شده هر دو تیمار منجر به شناسایی باند محصول RT-PCR گردید، در حالی که انجام این آزمایش بر روی بافت ماهیان بقا یافته منجر به شناسایی ژنوم SVCV در ماهیان بقا یافته تیمار انتقال افقی گردید. بر اساس نتایج، ماهی سفید دریای خزر نسبت به SVCV حساس بوده و میزان بروز بیماری و تلفات بستگی به مسیر انتقال عفونت دارد. همچنین به نظر می‌رسد که در مواردی ایجاد عفونت ممکن است بدون علائم بالینی بوده و ماهیان به ظاهر سالم به عنوان ناقل ویروس عمل نموده و عامل انتقال عفونت به جمعیت ماهیان سالم باشند.

واژگان کلیدی: ویرمی بهاره کپور (SVC)، کشت سلولی، ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم.

مقدمه

ویرمی بهاره کپور ماهیان (Spring Viraemia of Carp) نام یک بیماری به شدت کشنده و مسری در خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) و گونه‌های مرتبط با آنان می‌باشد. مهم‌ترین علائم بیماری شامل خونریزی‌های زیرپوستی، تورم شکمی، بیرون‌زدگی چشم‌ها، عدم تعادل و مرگ ماهیان می‌باشد و میزان تلفات گاهی تا ۷۰ درصد گزارش شده است (Ahne *et al*., 2002). بنابراین شیوع این بیماری به میزان بسیار زیادی می‌تواند تأثیرات مخرب اقتصادی و زیست محیطی برجای گذارد. عامل این بیماری یک ویروس متعلق به

Archive of SID
www.SID.ir

خانواده رابدوویریده بوده و در جنس *Rhabdovirus carpio* قرار دارد. این ویروس بنا بر گزارشات سازمان جهانی بهداشت حیوانات، OIE، در زمره خطرناک‌ترین ویروس‌های آبزیان در نظر گرفته می‌شود (OIE, 2012).

وقتی عامل این بیماری، در منطقه‌ای تثبیت گردد، حذف آن بسیار مشکل بوده و نیازمند از بین بردن کلیه اشکال حیات آبی در مناطق آلوده می‌باشد. انتقال این ویروس بین ماهیان اغلب به صورت افقی (ماهی – ماهی) از طریق ترشحات و مدفوع ماهی آلوده رخ می‌دهد (OIE, 2012). بیماری ویرمی بهاره کپور ماهیان معمولاً در فصل بهار، زمانی که دمای آب بین ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد است و ماهیان به تازگی دوران استرسی سرمای زمستان را سپری کرده‌اند، دارای بیش‌ترین موارد شیوع می‌باشد (Ahne *et al.*, 2002). گزارش‌های متعددی از شیوع این بیماری در همه نقاط دنیا از جمله کشورهایی همچون انگلستان (Dixon *et al.*, 1994)، روسیه، بلاروس، گرجستان و سایر کشورهای اروپای شرقی (OIE, 2012) و همچنین خاورمیانه (Dixon, 2006) وجود دارد. علاوه بر این، در سالیان اخیر شیوع این بیماری در چین (Liu *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2007) و آمریکا (Dikkeboom *et al.*, 2004) نیز به ثبت رسیده است. در سال ۲۰۰۸ حقیقی و همکاران وجود ویروس عامل این بیماری را در مزارع پرورش قزل‌آلای شمال ایران و همچنین کپورماهیان پرورشی گزارش نمودند (Haghighi e*t al*., 2008 a, b).

بیماری ویرمی بهاره کپور ماهیان یک تهدید همیشگی در صنعت پرورش ماهی و به ویژه پرورش کپور ماهیان به شمار می‌رود. ماهی سفید خزری (*Rutilus frisii kutum*) از لحاظ فیلوژنی در خانواده کپور ماهیان قرار دارد و یکی از گونه‌های ارزشمند دریای خزر و مناطق آبی اطراف آن می‌باشد که سالانه بخش عمده‌ای از صید ماهیان خزری را به خود اختصاص می‌دهد (صالحی، ۱۳۸۱؛ عباسی و همکاران، ۱۳۸۱). پراکنش این ماهی در حوزه جنوبی دریای خزر از رودخانه کورا در غرب دریای خزر تا رودخانه اترک در شرق این دریا می‌باشد (رضوی، ۱۳۷۴). ارزش اقتصادی بالای این ماهی سبب صید بیش از حد آن در سالیان گذشته گردیده است. به ویژه صید مولدین درشت که منجر به کاهش وزن و اندازه ماهی سفید در نسل‌های بعدی گردیده است. از سوی دیگر عوامل متعددی همچون تخریب زیستگاه‌های ماهی، افزایش آلودگی‌های زیست محیطی، احداث سدها و آب بندها در مسیر مهاجرت این ماهی و کاهش آب دریای خزر سبب کاهش شدید ذخائر ماهی سفید خزری گردیده است. ارزش و اهمیت اقتصادی بالای ماهی سفید از یک سو و کاهش ذخائر آن در دریای خزر از سوی دیگر، سبب ترغیب سرمایه گذاری‌ها جهت پرورش مصنوعی ماهی سفید در حوضچه‌های پرورش ماهی گردیده است.

با توجه به این‌که بسیاری از کپور ماهیان نسبت به SVCV حساس می‌باشند، بررسی میزان حساسیت این ماهی با ارزش دریای خزر نسبت به این ویروس به منظور به بکارگیری امکانات و استراتژی‌های پیشگیرانه و درمانی موثر در صنعت پرورش ماهی سفید، منطقی به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت عفونت‌زایی و بیماریزایی ویروس ویرمی بهاره کپورماهیان در ماهی سفید خزری از طریق مواجه‌سازی گوارشی ویروس و همچنین انتقال افقی ویروس از ماهیان آلوده به ماهیان سالم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق سویه ویروسی ۵۶/۷۰ ویروس SVC با شماره ثبت ژن Z۳۷۵۰۵/۱، که از آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا واقع در کشور دانمارک تهیه گردیده بود، مورد استفاده قرار گرفت. جهت تکثیر و تیتراسیون ویروس از تیره سلولی EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprinid*) و محیط EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) استفاده گردید. پس از تزریق ویروس به محیط کشت سلولی و بروز آثار آسیب سلولی ناشی از تکثیر ویروس، محیط EMEM حاوی ویروس با سرعت ۲۰۰۰×g، به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به عنوان محلول حاوی ویروس جهت انجام آزمایشات مواجه سازی مورد استفاده قرار گرفت. پس از خالص‌سازی محلول حاوی ویروس، تیتراسیون ویروس از طریق تعیین $TCID_{50}$ به روش رقیق سازی سریالی در پلیت‌های ۹۶ گوده ته گرد انجام پذیرفت. به این منظور نمونه ویروسی 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 به پلیت ۹۶ گوده حاوی تیره سلولی

Archive of SID
www.SID.ir

EPC تلقیح شده و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند. تمامی خانه‌های تلقیح شده به مدت هفت روز و به صورت روزانه از نظر بروز آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفته و $TCID_{50}$ به عنوان غلظتی از ویروس که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰ درصد از خانه‌های پلیت کشت سلولی گردد، محاسبه گردیده (Reed and Muench, 1938; Burleson *et al*., 1992) و به این ترتیب دوز تلقیح تعیین شد.

در این تحقیق از ۹۰ قطعه بچه ماهیان سفید انگشت قد با وزن تقریبی ۳ گرم که از مرکز بازسازی و تکثیر ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری تهیه شدند، استفاده گردید. ماهیان به طور تصادفی به شش گروه مساوی در دو دسته سه تایی (۳-۱) A و (۳-۱) B تقسیم شدند که به صورت دو تیمار انتقال افقی و گوارشی با دو تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر تیمار ۱۵ قطعه ماهی سفید قرار داده شدند. گروه A_1 و B_1 نیز به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند و هیچ ویروسی دریافت نکردند. در طول دوران انجام آزمون مواجه سازی تجربی دمای آب آکواریوم‌ها در محدوده ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

در این روش از گرانول‌های غذایی آلوده به ویروس استفاده گردید. برای این منظور، غذای ماهیان به مدت یک دقیقه در محیط کشت EMEM حاوی ویروس با غلظت $TCID_{50}/mL$ ۱۰^۵ × ۶/۵ قرار داده شد و سپس ماهیان به صورت انفرادی به میزان ۱ درصد وزن خودشان با این غذا تغذیه شده و به آکواریوم‌های خود انتقال یافتند. ماهیان کنترل منفی نیز به طرزی مشابه با غذای آغشته به محیط EMEM فاقد ویروس تغذیه شده و به آکواریوم خود باز گردانده شدند.

جهت انجام مواجه سازی به روش انتقال افقی ویروس، در هر آکواریوم سه ماهی به میزان ده میکرولیتر با محیط EMEM حاوی ویروس با غلظت $TCID_{50}/mL$ ۱۰^۵ × ۶/۵ و به صورت درون صفاقی تزریق شده و پس از علامت گذاری جهت افتراق ماهیان آلوده و غیر آلوده با قطع باله پشتی، به ۱۲ قطعه ماهی سالم موجود در آکواریوم‌های خود افزوده شدند. جمعیت مورد مطالعه در این تیمار ماهیان تزریق نشده‌ای بودند که به صورت همزیست با ماهیان تزریق شده در یک آکواریوم قرار داشتند. در آکواریوم کنترل منفی نیز سه ماهی با حجمی مشابه از محیط EMEM استریل تزریق شده و به سایر ماهیان افزوده شدند.

همه ماهیان مورد مطالعه در شرایط یکسان از نظر تغذیه، اکسیژن و دمای محیط قرار گرفتند و به مدت شش هفته از نظر بروز تغییرات رفتاری و علائم بالینی بررسی شدند. طی این مدت ماهیان به محض بروز تلفات نمونه‌برداری شده و جهت انجام آزمایشات ویروس‌شناسی و مولکولی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. علاوه بر این، آن دسته از ماهیانی که تا پایان دوران مطالعه بقاء یافته بودند. جهت انجام آزمایش مولکولی RT-PCR به منظور بررسی احتمال وجود عفونت مخفی نمونه‌برداری شدند. پس از پایان دوران مواجه سازی، ماهیان کالبد گشایی شده و اندام‌های داخلی شامل کبد، طحال، کلیه و آبشش‌ها در محیط EMEM استریل هموژن شده و پس از فیلتراسیون با فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ µm جهت جداسازی ویروس به تک لایه سلولی EPC تلقیح شده و به مدت هفت روز از نظر بروز آثار آسیب سلولی بررسی شدند.

به دنبال بروز آثار آسیب سلولی، نمونه‌های مثبت جهت تائید حضور آنتی ژن ویروس با روش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم (IFAT) مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، پس از خالی کردن محتویات پلیت‌های مذکور، ۲۰۰ میکرولیتر متانول سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه به پلیت‌ها افزوده شد تا سلول‌ها بر روی پلیت ثابت گردند. پس از خشک شدن پلیت‌ها، آنتی بادی خرگوشی اختصاصی ضد SVCV (تهیه شده از آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا واقع در کشور دانمارک) به نسبت ۱:۵۰۰ با PBS (Phosphate buffer saline) رقیق شده و به میزان ۳۰ میکرولیتر به هر خانه پلیت اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. در مرحله بعد، پلیت‌ها سه بار با استفاده از PBS شستشو داده شده و ۳۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد خرگوشی IgG کونژوگه با فلوئورسین ایزوتیوسیانات (Razi Biotech) اضافه گردید. پس از گرمخانه گذاری به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ، پلیت‌ها سه بار با استفاده از PBS شستشو داده شده و زیر پرتو ماوراء بنفش از نظر وجود نقاط درخشان بررسی گردیدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جهت بررسی حضور ویروس در بافت ماهیان تلف شده و بقا یافته، از تکنیک مولکولی RT-PCR استفاده گردید. به منظور استخراج RNA کل از کیت استخراج RNeasy و طبق دستورالعمل سازنده کیت (شرکت Qiagen) استفاده گردید. به طور خلاصه، ۳۰ میلی‌گرم از بافت ماهیان پس از هوموژن شدن در بافر RLT به مدت ۳ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸۰۰۰×g سانتریفوژ گردید و RNA کل توسط اتانل و با استفاده از ستون‌های فیلتردار رسوب دهی گردید. آزمایش RT-PCR نیز با استفاده از کیت یک مرحله‌ای Qiagen انجام پذیرفت. مواد مورد استفاده برای انجام این آزمایش شامل ۵ میکرولیتر بافر RT-PCR ۵x، یک میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها، یک میکرولیتر مخلوط آنزیمی RT-PCR، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر فاقد RNase و دو میکرولیتر پرایمر بودند که به ۳ میکرولیتر RNA الگو اضافه گردیدند. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش بر اساس توالی نوکلئوتیدی ۸۳۵–۸۱۴ و ۱۲۸۳–۱۲۶۲ ژن گلیکوپروتئین G ویروس انتخاب شدند (Koutna, 2003). مراحل انجام RT-PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bioer XP cycler) انجام پذیرفت. مخلوط واکنش‌ها جهت ساختن cDNA ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در مرحله بعد ۳۵ سیکل PCR اجرا گردید. هر سیکل شامل مرحله واسرشت (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ، مرحله اتصال (Anealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله ساخت (Polymerization) به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. مرحله پایانی واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. در نهایت محصول ۴۷۰ جفت بازی RT-PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و زیر نور UV آشکارسازی شد.

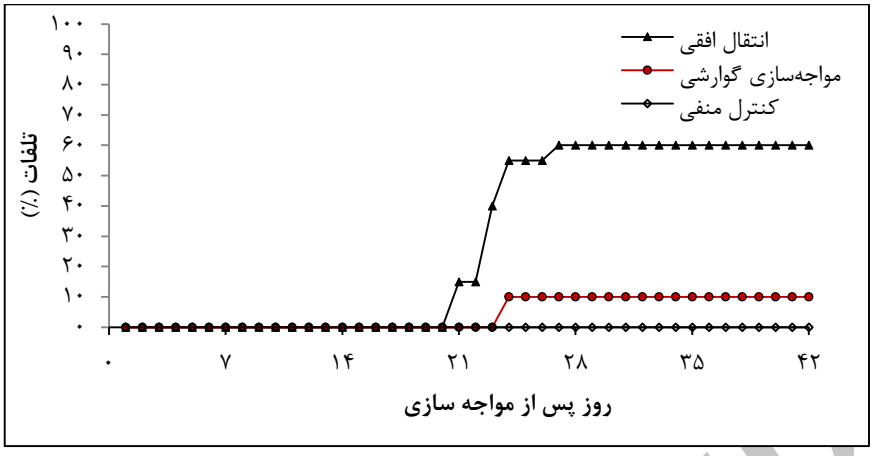
نتایج

اولین علائم بیماری در روز ۱۶ پس از مواجه سازی در تیمار انتقال افقی مشاهده گردید و بروز اولین تلفات در این تیمار در روز ۲۱ پس از چالش صورت گرفت. بروز تلفات در جمعیت ماهیان این تیمار به مدت یک هفته ادامه یافت و طی این مدت ۵۷ درصد از ماهیان دچار تلفات شدند. بروز اولین تلفات در تیمار مواجه سازی گوارشی به صورت ناگهانی و بدون بروز علائم بالینی و تنها در روز ۲۳ پس از مواجه سازی دیده شد. بررسی میزان تلفات این تیمار در پایان دوران مطالعه نشان داد که تنها ۱۰ درصد ماهیان مورد مطالعه این تیمار دچار تلفات گردیدند (شکل ۱). علاوه بر این هیچ‌گونه تلفاتی در ماهیان آکواریوم‌های کنترل منفی تا پایان دوران مطالعه مشاهده نشد. مهم‌ترین علائم بالینی مشاهده شده در تیمار انتقال افقی شامل بی‌اشتهایی، تیرگی بدن، بیرون‌زدگی چشم‌ها، شنای غیرعادی، وارونگی و خونریزی‌های زیر جلدی در ناحیه شکمی بود (شکل ۲). این در حالی است که علائم بالینی چندانی تا پایان دوران مواجه سازی در ماهیان تیمار مواجه سازی گوارشی مشاهده نشد.

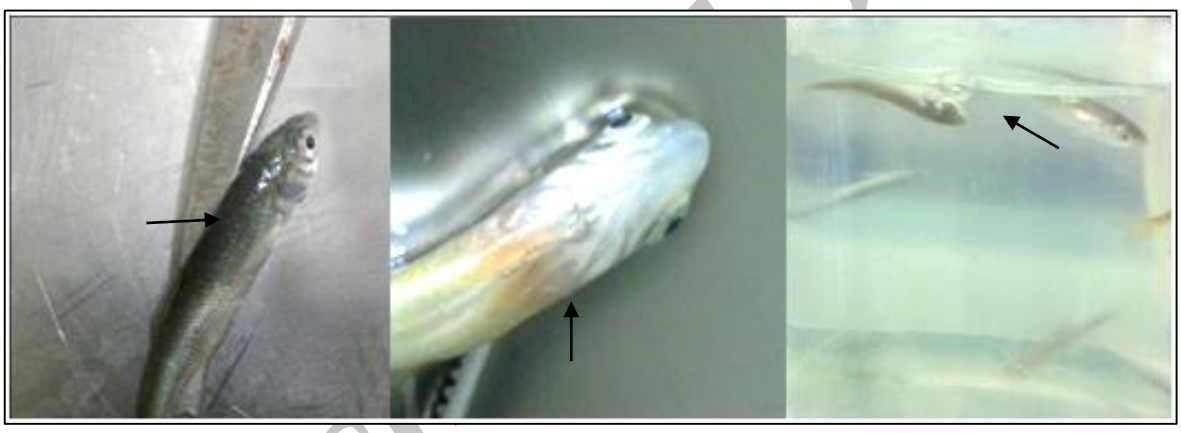
تلقیح هوموژن بافتی ماهیان تلف شده هر دو تیمار مورد مطالعه به کشت سلولی تیره EPC منجر به بروز آثار آسیب سلولی از روز چهارم تا هفتم پس از تلقیح گردید. آسیب‌های سلولی مشاهده شده شامل گرد شدن سلول‌ها و بروز لیزهای سلولی کانونی بود. این در حالی است که تلقیح هوموژن بافتی ماهیان کنترل منفی به کشت سلولی هیچگونه آسیب سلولی نشان نداد (شکل ۳). علاوه بر این، به منظور مقایسه حدت ویروس قبل و بعد از عفونت‌زایی تجربی، قابلیت عفونت‌زایی سویه ویروسی اولیه و ویروس‌های جداسازی شده از طریق تعیین $TCID_{50}$ اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که $TCID_{50}$ ویروس، قبل و بعد از مواجه سازی تجربی ثابت ماند. جهت تعیین ماهیت ویروس جداسازی شده از آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم استفاده گردید. انجام آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم منجر به تائید حضور آنتی‌ژن SVCV و در نتیجه تائید ماهیت ویروس‌های جداسازی شده به عنوان عامل ایجاد بیماری و بروز تلفات گردید (شکل ۴). در آزمایش RT-PCR حضور باند ۴۷۰bp در ماهیان تلف شده و بقاء یافته تیمار انتقال افقی و همچنین در ماهیان تلف شده تیمار انتقال گوارشی مشاهده شد (شکل ۵).

Archive of SID

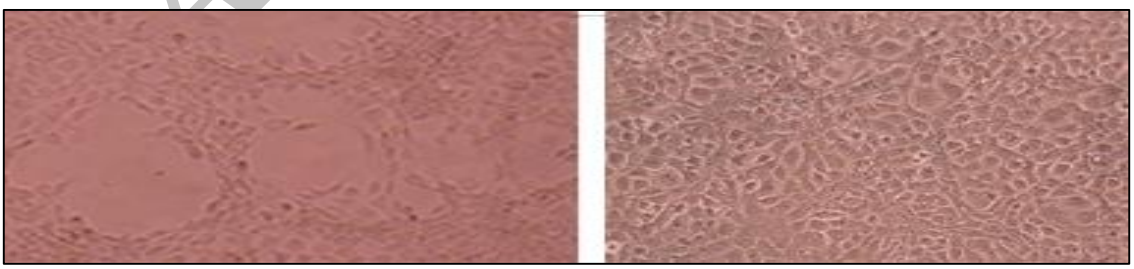
www.SID.ir



شکل ۱: میزان تلفات مشاهده شده در ماهی سفید خزری (*R. frisii Kutum*) پس از مواجه سازی تجربی با SVCV.

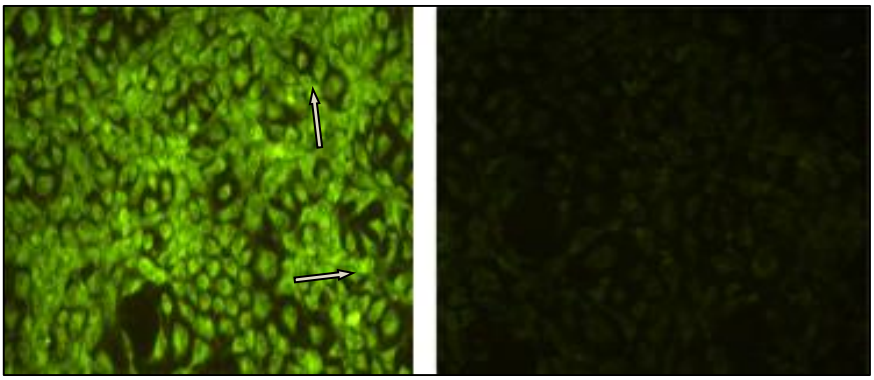


شکل ۲: علائم بالینی مشاهده شده در ماهی سفید خزری (*R.frisii Kutum*) پس از مواجه‌سازی تجربی با SVCV. عدم تعادل و وارونگی در ماهیان بیمار (راست)، خونریزی‌های زیر جلدی در ناحیه شکمی (وسط) و تیرگی بدن (چپ).

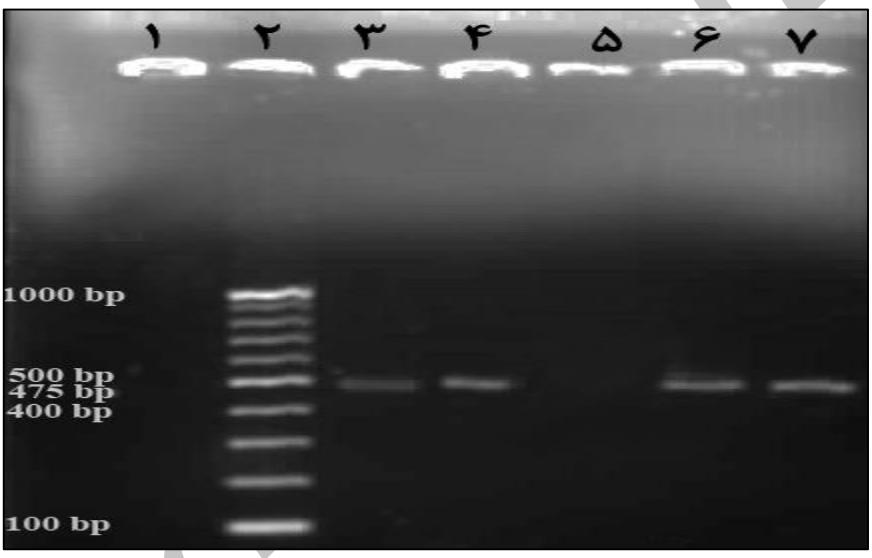


شکل ۳: تیره سلولی EPC چهار روز پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهیان کنترل منفی (راست)، آسیب سلولی ناشی از تکثیر SVCV بر روی تیره سلولی EPC چهار روز پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهیان تلف شده (چپ) (بزرگنمایی ۲۰۰×).

www.SID.ir



شکل ٤: آزمایش آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم بر روی کشت سلولی EPC پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهیان کنترل منفی (راست) و ماهیان تلف شده (چپ). نقاط درخشان نشان دهنده حضور آنتی‌ژن ویروس می‌باشند (بزرگنمایی ×۲۰۰).



شکل ٥ : نتایج آزمایش RT-PCR بر روی بافت ماهیان سفید تلف شده و بقاء یافته پس از مواجه‌سازی با SVCV.

۱- کنترل منفی، ۲- مارکر DNA(ساخت شرکت Vivantis)، ۳- کنترل مثبت (شماره ثبت ژن Z۳۷۵۰۵/۱)، ۴- ماهیان تلف‌شده تیمار مواجه‌سازی گوارشی، ۵- ماهیان بقا یافته تیمار مواجه‌سازی گوارشی، ۶- ماهیان تلف شده تیمار انتقال افقی، ۷- ماهیان بقا یافته تیمار انتقال افقی.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، بیماریزایی تجربی با دو روش انتقال افقی و گوارشی با سویه استاندارد رابدوویروس کارپیو (شماره ثبت ژن Z۳۷۵۰۵/۱) در ماهی سفید خزری (*Rutilus frisii kutum*) که بومی مناطق جنوبی دریای خزر است، انجام شد. حساسیت ماهی سفید خزری نسبت به SVCV ناشناخته است و بیماریزایی تجربی می‌تواند یک روش مفید برای تخمین تأثیر عفونت در پرورش صنعتی این گونه آبزی باشد. مطالعه میزان حساسیت ماهی سفید خزری به ویروس ویرمی بهاره کپور به چند دلیل اهمیت دارد: این ماهی جزء خانواده کپورماهیان است و تاکنون حساسیت آن به این ویروس مورد بررسی قرار نگرفته است. ماهی سفید خزری جزو ماهیان وحشی دریای خزر است که در صورت

www.SID.ir

آلودگی به این ویروس می‌تواند ویروس را در سطح وسیعی در دریای خزر و حوضه آبریز آن گسترش دهد. شیلات ایران گام‌های بزرگی در جهت پرورش صنعتی این گونه برداشته است که پیش از توسعه این صنعت، این گونه مهمترین ماهی استخوانی دریای خزر بوده که از نظر اقتصاد شیلاتی، بازار پسندی و حجم صید در رتبه اول قرار دارد و در صورت درگیری با این ویروس ضررهای اقتصادی زیادی به این صنعت تحمیل خواهد شد. بنابراین، این گونه به طور بالقوه موضوع خوبی برای بررسی عفونت با این ویروس می‌باشد. انتقال SVCV به صورت افقی بوده و می‌تواند از طریق ماهی بیمار، آب آلوده و سایر حاملین زنده و غیر زنده صورت پذیرد (Fijan, 1988). بنابراین در این تحقیق انتقال افقی از طریق ماهی آلوده (که به صورت تزریق درون صفاقی با ویروس SVC آلوده شده بودند) به ماهی سالم و انتقال گوارشی از طریق غذای آغشته به سوسپانسیون ویروسی به عنوان حامل غیر زنده بررسی شد.

بر اساس نتایج، میزان حساسیت ماهی سفید خزری نسبت به SVCV بستگی به نحوه مواجهه ماهی با ویروس دارد. به نظر می‌رسد مواجه سازی به روش انتقال افقی به عنوان طبیعی‌ترین نحوه انتقال عفونت SVCV، روش مؤثرتری در ایجاد عفونت پایدار و به دنبال آن بیماری در ماهی سفید می‌باشد. مواجه سازی به روش انتقال افقی منجر به بیماری و در نتیجه تلفات بالاتری در ماهی سفید خزری در مقایسه با تیمار انتقال گوارشی گردید. مقایسه میزان بروز تلفات نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار مورد مطالعه بود ($P<0/05$). تاکنون حساسیت برخی گونه‌های دیگر کپور ماهیان به SVCV به دنبال عفونت‌زایی تجربی نشان داده شده است (Haenen and Davidse, 1993; Sanderse, 2003; Dixon, 2008).

به نظر می‌رسد در تیمار انتقال افقی، SVCV قادر به بقاء و تکثیر در بدن ماهیان تزریق شده اولیه بوده و از طریق ترشح مخاط و مواد دفعی ماهیان آلوده به محیط آبی آزاد می‌گردد. در چنین شرایطی کل پیکره سایر ماهیان در تماس با ویروس بوده و امکان سرایت عفونت از مسیرهای مختلف شامل مخاط آبشش، دهان و پوست وجود دارد. در مقابل، در تیمار مواجه سازی گوارشی مسیر انتقال ویروس تنها به مسیر گوارشی محدود گردیده و به نظر می‌رسد امکان تثبیت عفونت و بروز بیماری کاهش یافته و بیماری سیر پیشرفت آهسته‌تری به خود می‌گیرد (Schonherz *et al*., 2012). علاوه بر این، میزان کم تلفات این تیمار در مقایسه با تیمار انتقال افقی ممکن است به دلیل غیر فعال شدن و در نتیجه کاهش تیتر ویروس در سیستم گوارشی ماهی باشد (Hawley and Graver, 2008). اگرچه این موضوع جهت تائید نیازمند بررسی‌های بیش‌تری می‌باشد. تلقیح هوموژن بافتی ماهیان تلف شده هر دو تیمار منجر به بروز آثار سلولی در سلول‌های EPC گردید. بنابراین به نظر می‌رسد که ویروس پس از ایجاد عفونت در پیکره ماهی سفید، همچنان قدرت تکثیر و عفونت‌زایی خود را حفظ نموده و سبب ایجاد آثار آسیب سلولی در کشت سلولی گردیده است. علاوه بر این، مقایسه حدت ویروس قبل و بعد از عفونت‌زایی تجربی نشان داد که پس از یک دور عفونت در ماهی سفید هیچگونه تغییری در قدرت عفونت‌زایی SVCV به وجود نیامد. همچنین انجام آزمایش آنتی‌بادی درخشان غیر مستقیم پس از بروز آثار آسیب سلولی منجر به تائید حضور آنتی‌ژن ویروسی و در نتیجه تائید ماهیت ویروس‌های جداسازی شده در کشت سلولی به عنوان عامل ایجاد بیماری و بروز تلفات گردید. در حالیکه در مورد کشت سلولی ماهیان کنترل منفی هیچگونه آنتی‌ژن ویروسی شناسایی نشد.

تشخیص اسیدنوکلئیک ویروسی توسط RT-PCR به طور معمول حساس‌تر از جداسازی ویروس بر روی کشت سلولی است (Miller *et al*., 1998; Chico *et al*., 2006). همچنین بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE, 2012)، آزمایش‌های مولکولی و از جمله RT-PCR از حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین آزمایش‌های تشخیصی و تأییدی عفونت SVCV در نمونه‌های مشکوک به شمار می‌روند. نتایج آزمایش RT-PCR بر روی ماهیان تلف شده هر دو تیمار، نشان دهنده وجود عفونتSVCV و در نتیجه بیماری ناشی از آن به عنوان عامل بروز بیماری و تلفات بود. از سوی دیگر نتایج RT-PCR وجود اسیدنوکلئیک ویروس در ماهیان بقا یافته و به ظاهر سالم را در تیمار انتقال افقی تائید نمود. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که ماهی سفید خزری نه تنها می‌تواند به عنوان یک گونه از کپور ماهیان حساس به SVCV در نظر گرفته شود بلکه می‌تواند همانند بسیاری از کپورماهیان دیگر به عنوان حامل ویروس مطرح بوده و عامل انتقال عفونت به جمعیت ماهیان سالم در نظر گرفته شود (OIE, 2012). از سوی دیگر، عدم شناسایی اسیدنوکلئیک ویروسی در

Archive of SID
www.SID.ir

ماهیان بقاء یافته تیمار مواجه سازی گوارشی ممکن است به دلیل عدم قابلیت تثبیت و تکثیر SVCV در سیستم گوارشی ماهی و در نتیجه عدم وجود تیتر کافی ویروس جهت شناسایی باشد.

در این مطالعه برای اولین بار به بررسی قابلیت عفونت‌زایی و ایجاد بیماری توسط SVCV در ماهی سفید خزری پرداخته شد. این مطالعه به عنوان یکی از اولویت‌های مهم جهت انجام مطالعات تجربی بعدی در شناسایی بیولوژی SVCV در ماهی سفید خزری و همچنین سایر کپورماهیان در جهت طراحی واکسن‌های موثر علیه ویرمی بهاره کپور و بکارگیری استراتژی‌های پیشگیرانه و درمانی موثر ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

رضوی، ب.، ۱۳۷٤. ماهی سفید. موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۶۵ ص.

صالحی، ح.، ۱۳۸۱. تحلیل اقتصادی تولید و رهاسازی بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در ایران. مجله علوم دریایی، دوره ۲، شماره ۱، صفحات ۴۵-۳۵.

عباسی، ک.، ولی پور، ع. و نظامی، ش.، ۱۳۸۱. اطلس ماهیان رودخانه سفید رود در تالاب بندر انزلی. مرکز تحقیقات شیلات گیلان، صفحات ۶۲-۶۱.

Ahne, W., Bjorklund, H. V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. and Winton, J. R., 2002. Spring viremia of carp (SVC). Diseases of Aquatic organisms, 52: 261–272.

Burleson, F. G., Chambers, T. M. and Wiedbrauk, D. L., 1992. Virology, a Laboratory Manual. Academic Press, London.

Chico, V., Gomez, N., Estepa, A. and Perez, L., 2006. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. Journal of virol Methods, 132: 154–159.

Dikkeboom, A., Radi, C., Toohey-Kurth, K., Marcquenski, S., Engel, M., Goodwin, A.E., Way. K., Stone, D.M. and 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.

Dixon, P. F., 2006. Datasheet on spring viraemia of carp. In: Aquaculture Compendium. CAB International, Wallingford, UK.

Dixon, P. F., 2008. Virus diseases of cyprinids. In: Fish Diseases, Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli, T. & Kapoor, B.G. eds. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp. 87–184.

Dixon, P. F., Hattenberger Baudouy, A. M. and Way, K., 1994. Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. Diseases of Aquatic organisms, 19: 181–186.

Fijan, N., 1988. Vaccination against spring viraemia of carp. In: Fish Vaccination, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK, pp. 204–215.

Haenen, L. M. and Davidse, A., 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viraemia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. Diseases of Aquatic organisms, 15: 87-92.

Haghighi, A., Khiabanian Asl A., Bandehpoor, M. Sharifnia, Z. and Kazemi, B., 2008a. The first report of speing viremia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary and advances, 3: 263-268.

Haghighi, A., Khiabanian Asl A., Azizzade, M., Bandehpoor, M., Sharifnia, Z. and Kazemi, B., 2008b. The first report of SVC from Indian carp species by PCR and Histopathologic methods in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(24): 2675-2678.

Hawley, L. M. and Garver, K. A., 2008. Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. Diseases of Aquatic organisms, 82: 171– 178.

Koutna, M., Vesely, T., Psikal, I. and Hulova, J., 2003. Identification of spring viremia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. Diseases of Aquatic organisms, 55: 229-235.

Archive of SID

www.SID.ir

Liu, H., Gao, L., Shi, X., Gu, T., Liang, Y. and Chen, H., 2004. Isolation of spring viremia of carp virus (SVCV) from cultured Koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus Carpio Carpio*) in PR China. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 24: 192-202.

Miller, T. A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann. R. W. and Enzmann, P. J., 1998. Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ sample sand cultured cells. Diseases of Aquatic organisms, 34: 13-20.

Office International des Epizooties (OIE), 2012. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Pring viremia of carp, Chapter 2.3.8. pp. 357-373.

Reed, L. J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American Journal of Epidemiology, 27, 493–497.

Sanders, G. E., Batts, W. N. and Winton, J. R., 2003. Susceptibility of Zebrafish (*Danio rerio*) to a Model Pathogen, Spring Viremia of Carp Virus Comparative Medicine, 53(5): 514-521.

Schonherz, A. A., Hansen, M. H. H., Jørgensen, H. B. H., Berg, P., Lorenzen, N. and Einer Jensen, K., 2012. Oral transmission as a route of infection for viral haemorrhagicsepticaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 35: 395–406.

Teng, Y., Liu, H., Lv, J. Q., Fan, W. H., Zhang, Q. Y., and Qin, Q. W., 2007. Characterization complete genome sequence of spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. Archives of Virology, 152: 1457-1465.

Archive of SID

www.SID.ir