

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

فیروز فدایی فرد<sup>۱\*</sup> مهدی رئیسی<sup>۱</sup> منوچهر مومنی<sup>۲</sup> مصطفی فغانی<sup>۳</sup>

(۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

(۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

(۳) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

(دریافت مقاله: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۱، پذیرش نهایی: ۱۳ شهریور ماه ۱۳۹۱)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** بیماریهای نکروز عفونی مراکز خون ساز (IHN)، سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS) و نکروز عفونی لوزالمعده (IPN) از جمله بیماریهای ویروسی مهم آزاد ماهیان پرورشی به شمار می‌روند که منجر به بروز تلفات گسترده در بین آنها می‌شوند. هدف: تحقیق حاضر با هدف بررسی وضعیت آلودگی ویروس‌های فوق در تخم‌های چشم‌زده ایرانی و خارجی و میزان پراکنش این ویروس‌ها در بین مزارع تکثیر استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. **روش کار:** از این روسته شهرستان فارس، کوه‌رنگ و لردگان انتخاب و در هر شهرستان نمونه‌گیری از سه مرکز تکثیر صورت پذیرفت. از هر مزرعه نیز به طور تصادفی ۲۰ عدد تخم (سبزی چشم‌زده) برداشت نموده و با قرار دادن در لوله‌های درب دار استریل، پس از ثبت برخی فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب، جهت ردیابی مولکولی ویروس‌های فوق با تست Reverse Transcriptase-PCR به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ارسال شد. **نتایج:** طی این تحقیق ۲۳/۳٪ تخم‌های مورد مطالعه آلوده و ۷۶/۷٪ آنها غیر آلوده بود. میزان آلودگی نیز در ویروس‌های IPN، IHN و VHS به ترتیب ۱۲/۵، ۱۰/۸۳ و ۰/۸۳٪ بود. شهرستان فارس با ۱۹/۱۵٪ بیشترین و شهرستان‌های لردگان و کوه‌رنگ با ۳/۳۳ و ۰/۸۳٪ کمترین میزان آلودگی را در بین مناطق مورد بررسی به خود اختصاص داده‌اند. همچنین در مقایسه میزان آلودگی تخم‌ها بر اساس منبع ایرانی یا خارجی بودن آنها، میزان آلودگی در تخم‌های ایرانی ۲۰٪ و در تخم‌های خارجی ۳/۳۳٪ بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتیجه کلی تحقیق حاضر نشان از آلودگی نسبی تخم‌های چشم‌زده قزل‌آلای رنگین‌کمان به ویروس‌های بیماریزای فوق و توجه به اهمیت همه‌گیر شناختی آن در بین مزارع پرورشی آن استان و سایر استان‌های کشور دارد.

**واژه‌های کلیدی:** IHN، IPN، VHS، تخم چشم‌زده، چهارمحال و بختیاری.

## مقدمه

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

بیماری نکروز عفونی مراکز خون‌ساز (IHN) یک بیماری ویروسی ناشی از رابدو ویروس‌ها است که از بیماریهای مهم آزاد ماهیان بالاحص قزل‌آلای رنگین‌کمان به شمار می‌رود و بسته به اندازه ماهیان، سویه ویروس و شرایط محیطی مثل دما و میزان شیوع بیماری امکان تلفات تا ۱۰۰٪ در بین ماهیان وجود دارد. بیماری در دمای بالاتر یا در ماهیان درشت تر شکل مزمن به خود می‌گیرد. تنها راه اجتناب از ویروس بیماریزای IHN،

ضد عفونی تخم‌های وارد شده به مزرعه با ترکیبات ید دار، استفاده از منابع آب بدون پاتوژن در مزرعه و رعایت اصول دقیق بهداشتی در هجری هاست (۷). وقوع بیماری IHN در ایران و شناسایی آن در تخم و بچه ماهیان قزل‌آلا توسط برخی محققین گزارش شده است (۲۰۶، ۱۰، ۱۷). بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده (VHS) نیز با عامل رابدو ویروسی موجب تلفات بالاد در آزاد ماهیان می‌گردد این ویروس در اکثر مناطق اروپا به صورت اندمیک در آمده است. ویروس VHS یکی از پاتوژن‌های مهم مزارع پرورشی ماهیان آب شیرین و شور است که بر خلاف IHN به صورت شاخص در ماهیان قزل‌آلای با اندازه بزرگ بروز می‌کند. یکی از شیوه‌های جدید معرفی شده در پایش این ویروس در محیط‌های طبیعی و آزمایشگاهی استفاده از تکنیک جدیدی از PCR به نام assay (qRT-PCR) می‌باشد که این آزمون در ردیابی سریع ماهیان قبل از تأیید از طریق کشت سلولی و بالاحص در ردیابی عفونت در ماهیانی که علائم کلینیکی بیماری را نشان نمی‌دهند کارایی بالایی دارد (۵).

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



معکوس چندگانه (Multiplex Reverse Transcriptase PCR) به منظور ردیابی هر سه ویروس در آنها بر اساس پروتکل اعلام شده توسط Williams و همکاران در سال ۱۹۹۹ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶). لذا از پرایمرهای مربوط به هر ویروس با توالی، اندازه باند و ژن هدف مشخص استفاده گردید (جدول ۱).

۳- فرآیند تشخیص مولکولی و واکنش زنجیره ای پلیمرز: با توجه به اینکه سه ویروس مختلف بایستی ردیابی می شد لذا بدین منظور ابتدا نمونه های تخم هر مزرعه و هر شهرستان به تفکیک مشخص و اقدام به آماده سازی تیوبهای مخصوص نمونه گردید بطوریکه هر ۵ عدد تخم (از هر ۲۰ تخم هر هجری) را به طور تصادفی و از انکوباتورهای مختلف وارد یک لوله کرده و آن را کاملاً به هم زده تا یک مخلوط یکنواخت حاصل گردید. جهت استخراج RNA از نمونه های مورد مطالعه از کیت Tripure ساخت شرکت Roche applied science طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد. جهت ساخت cDNA از نمونه های RNA استخراج شده در مرحله اول ۵۰ μL، DEPC-Water به همراه ۱ μL Random Hexamer و ۲ μL از RNA مربوط به هر نمونه در یک لوله استریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه گردید. پس از ۵ دقیقه سرد کردن لوله روی یخ به مخلوط فوق ۵ μL RT buffer 5X، ۲ μL، M-Mulv، ۱۰ mM dNTP، ۱ μL، آنزیم M-Mulv اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. جهت انجام آمیاش PCR و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از دستگاه (Eppendorf) Cyclo gradient و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از دستگاه (Eppendorf) Cyclo gradient Master با حجم ۵۰ μL و اجد ۵ μL، PCR buffer 10X، ۱۰ mM، MgCl<sub>2</sub> ۱۵۰ μmol، dNTP ۱۰۰ pmol، از زوج پرایمرهای R و F، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ μL از cDNA مربوط به هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴°C ۴ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴°C، ۳۰ ثانیه، ۶۰°C، ۳۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲°C، ۱۰ دقیقه. جهت تائید وجود قطعات تکثیر یافته، ۲۰ μL از محصول PCR روی ژل ۱٪ آگاروز واجد اتیدایوم بروماید در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکترو فورز گردید.

### نتایج

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

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

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

### مواد و روش کار

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

۲- عملیات آزمایشگاهی و انتخاب پرایمرها: تخم ها بعد از ورود به آزمایشگاه ابتدا در فریزر ۷۰°C- نگهداری شده تا اقدامات بعدی بر روی آنها انجام گردد. سپس نمونه ها با استفاده از آزمون ترانس کریپتاز



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

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

جدول ۲- میزان آلودگی تخم چشم زده (داخلی و خارجی) به ویروس های IHN، VHS، IPN در استان چهارمحال و بختیاری (از ۱۸۰ نمونه کل).

منطقه	لردگان		کوهرنگ		فارسان		کل (نمونه های مثبت)	
	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	تعداد	درصد
VHS	۱۵	۰	۱۰	۰	۱۴	۰	۱	۰/۸۳
IHN	۱۴	۰/۸۳	۱۰	۰	۴	۳/۳۳	۱۱	۱۰
IPN	۱۲	۲/۵	۹	۰/۸۳	۴	۳/۳۳	۱۱	۱۲/۵
جمع	۴۱	۳/۳۳	۲۹	۰/۸۳	۲۲	۱۸/۳۳	۲۳	۲۳/۳۳

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

منبع تخم ویروس	خارجی		ایرانی		کل (نمونه های مثبت)	
	منفی	مثبت	منفی	مثبت	تعداد	درصد
VHS	۲۱	۰/۸۳	۱۸	۱۵	۱	۰/۸۳
IHN	۱۷	۰/۸۳	۱۰	۸/۳۳	۱۱	۹/۱۶
IPN	۱۸	۱/۷۶	۸	۶/۶۶	۱۳	۱۰/۸۳
جمع	۵۶	۳/۳۳	۳۶	۳۰	۲۴	۲۳/۳۳

و ۰/۸۳٪ آلودگی بوده اند. در مقایسه بین پراکنش ویروس ها میان تخم های داخلی و خارجی نیز آلودگی تخم های ایرانی نسبت به تخم های خارجی بالاتر بود (جدول ۳). بطوریکه تخم های چشم زده ایرانی با ۲۰٪ و خارجی با ۳/۳۳٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی را داشته اند. البته در بین تخم های ایرانی نیز IPN بالاترین میزان درگیری را داشت. در ضمن دمای آب مزارع مختلف به ترتیب در مناطق فارسان، کوهرنگ و لردگان  $11^{\circ}\text{C}$  و  $8^{\circ}\text{C}$  بود.

### بحث

در سال های اخیر استفاده از تخم چشم زده در مزارع تکثیر و ندر و رشدی داشته بطوریکه بسیاری از مزارع پرورشی اقدام به خرید تخم از

مراکز داخل و خارج از کشور نموده و در امر تولید بچه ماهی مبادرت می ورزند با توجه به بروز برخی تلفات و علائم مشکوک به این بیماریها در مراکز تکثیر استان چهارمحال و بختیاری مقرر گردید مطالعه ای با هدف ردیابی مولکولی ویروس های فوق در مزارع تکثیر بچه ماهی سه شهرستان فارسان، لردگان و کوهرنگ که در زمینه خرید تخم چشم زده داخلی و خارجی از نقاط مختلف فعالیت دارند صورت پذیرد تا بتوان اطلاعات نسبی از وضعیت حضور عوامل ویروسی ذکر شده بدست آورد.

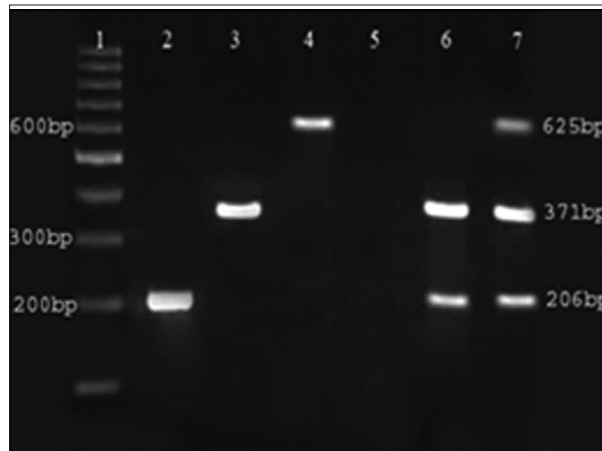
بیشترین میزان درگیری ویروسی در مطالعه حاضر در شهرستان فارسان (با سطح آلودگی ۱۹/۱۵٪) به چشم می خورد گرچه با توجه به تعداد نمونه ها و محاسبات آماری بدست آمده نمی توان نتیجه بدست آمده را در کل شهرستان تعمیم داد ولی از آنجائیکه میزان تولید بچه ماهی و خرید تخم چشم زده در این شهرستان از سطح بالایی برخوردار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



کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

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

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



تصویر ۱- شناسایی همزمان ویروس های IHN، VHS، IPN در ژل آگارز با تکنیک RT-PCR. لاین ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲: باند ۲۰۶ جفت باز ویروس IPN، لاین ۳: باند ۳۷۱ جفت باز ویروس IHN، لاین ۴: باند ۶۲۵ جفت باز ویروس VHS، لاین ۵: کنترل منفی، لاین های ۶ و ۷ حضور همزمان سه ویروس در ژل.

صورت گرفته است بطوریکه Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۰ (الف) با استفاده از تکنیک (RT-PCR) و بررسی بیش از ۱۵۰ لارو مشکوک به بیماری IHN با وزن کمتر از ۳g در مزارع پرورش قزل آلی استان چهارمحال و بختیاری متوجه آلودگی در ۳/۳۳٪ کل جمعیت مورد مطالعه شدند که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۱۰). همچنین Khabanian Asl و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز با استفاده از تست ایمنو هیستوشیمی و PCR ردیابی ویروس IHN را در برخی مزارع تکثیر بچه ماهی قزل آلی رنگین کمان ایران گزارش نمودند (۶). Fallahi و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز با استفاده از تست آنتی بادی درخشان به روش غیر مسقیم (antibody test indirect florescent) توانستند از بین ۹۹ نمونه ماهی، ۱۱ نمونه مثبت آلوده به ویروس IHN از استان چهارمحال و بختیاری گزارش کنند (۲). همچنین Zargar و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بهره گیری از دو تست آنتی بادی درخشان به روش غیر مسقیم و RT-PCR توانستند از ۳۰ مزرعه مورد مطالعه در این استان ۲۷ نمونه مثبت آلوده به IHN اعلام نمایند (۱۷). در ارتباط با تحقیقات انجام شده در خصوص IPN نیز می توان به کار Hosseini and Akhlaghi در سال ۲۰۰۷ اشاره داشت ایشان اولین گزارش ردیابی ویروس IPN را از بچه ماهیان ایران اعلام نمودند (۱). Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۰ (ب) نیز ماهیان مشکوک ۳۸ کارگاه تکثیر و پرورش در استانهای چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد را مورد بررسی قرار داده و ۱۲ مزرعه را آلوده به ویروس IPN اعلام نمودند. میزان آلودگی در چهارمحال ۳/۳۳٪ و در کهگیلویه ۵/۲۸٪ بود (۱۱). در ارتباط با ویروس VHS مطالعه چندانی در کشورمان انجام نگرفته و نتایج حاصل از تحقیق حاضر را می توان به عنوان یکی از مطالعات مستند مرتبط با این بیماری دانست گرچه که میزان فراوانی این ویروس نسبت به دو ویروس دیگر کمتر بوده است اما آگاهی از وجود ویروس و ادامه تحقیقات به منظور



## References

1. Akhlaghi, M., Hosseini, A. (2007) First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 27: 79-84.
  2. Fallahi, R., Soltani, M., Zorziazahra, M.E.J., Hemmatzadeh, F. (2006) Serological diagnosis of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in rainbow trout using indirect florescent antibody test. J. Vet. Res. 61: 19-22.
  3. FAO (2008) State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.
  4. Gunimaladevi, I., Kono, T., LaPatra, S.E., Sakai, M. (2005) A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Virol. 150: 899-909.
  5. Hope, K.M., Casey, R.N., Groocock, G.H., Getchell, R.G., Bowser, P.R., Casey, J.W. (2010) Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. J. Aquat. Anim. Health. 22: 50-61.
  6. Khiabaniasl, A.H., Soltani, M., Kazemi, B., Haghdoost, I.S., Sharifpour, I. (2007) Use of immunohistochemical and PCR methods in diagnosis of infection haematopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheries in Iran. Pak. J. Biol. Sci. 10: 230-234.
  7. Knüsel, R., Bergmann, S.M., Einer-Jensen, K., Casey, J., Segner, H., Wahli, T. (2007) Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHN in fish tissue sampled under field conditions? J. Fish. Dis. 30: 559-568.
  8. Millard, P.J., Bickerstaff, L.E., LaPatra, S.E., Kim, C.H. (2006) Detection of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus by molecular padlock amplification, J. Fish. Dis. 29: 201-213.
  9. Miller, T.A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, (9). سرو لوژی نیز از راههای پیشنهادی شناسایی ویروس IHN در ماهیان آزاد اقیانوس اطلس بوده است (۱۳). از تست های مولکولی جدیدتر بکار رفته در تشخیص ویروس های بیماریزای ماهی نیز می توان به کاربرد RT-PCR (۷)، استفاده از پروتکل amplification (RT-LAMP) استفاده Reverse Transcription Loop-mediated isothermal (۴)، استفاده از فناوری padlock probe (MPP) employing molecular (۸).
- در تحقیق حاضر که با هدف بررسی میزان آلودگی تخم های چشم زده داخلی و خارجی قزل آلا ی رنگین کمان به ویروس های IHN، IPN و VHS در محدوده استان چهارمحال و بختیاری انجام پذیرفت همانطور که در نتایج پیداست فراوانی حضور ویروس در شهرستان فارس از بقیه بیشتر بوده است که البته با مشاهدات به عمل آمده از تلفات بچه ماهیان و علائم همراه آن در این منطقه و بالا بودن آمار درگیری ویروسی در تحقیق حاضر می توان این ارتباط را بین آنها برقرار نمود ولی این خود مستلزم انجام تحقیقی دیگر با موضوعیت بررسی وضعیت ویروس های فوق در بچه ماهیان این مراکز می باشد تا بطور کاملاً منطقی وضعیت حضور ویروس های فوق را در بین بچه ماهیان نیز مشخص نمود. همچنین در مقایسه میزان آلودگی بین تخم های ایرانی و خارجی درصد آلودگی در تخم های ایرانی چندین برابر تخم های خارجی بوده است البته شواهد نشان از حضور هر سه ویروس بالاخص IHN و IPN در هر دو نوع تخم دارد که ضرورت بازنگری در برنامه های تولیدی مزارع تکثیر کشور را می طلبد. یکی از سیاست های مهم در برخورد با عوامل عفونی در آزیان اجرای پروتکل امنیت موجود زنده (Biosecurity) است بطوری که استفاده از قرنطینه، رعایت اصول بهداشتی و ضد عفونی ماهیان و تجهیزات امری لازم الاجرا است. همچنین یکی از جدیدترین شیوه های برخورد با عوامل ویروسی بکارگیری یک عامل ویروسی برای مقابله با عامل ویروسی دیگر است بطوریکه در سال های اخیر در پیشگیری از بیماری IHN ماهیان را در معرض ویروس IPN قرار داده و ایمنی ضد ویروس IHN را در ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان مشاهده کرده اند.

## تشکر و قدردانی

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

R.W., Enzmann, P.J. (1998) Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish



- pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquat. Org.* 34: 13-20.
10. Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M., Moumeni, M. (2010a) Use of RT-PCR in diagnosis of infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout hatcheries, *Iran. Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 1510-1514.
  11. Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M., Momeni, M., Hosseinifard, M. (2010b) Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in two major rainbow trout fry producing provinces of Iran with respect to clinically infected farms. *J. Food. Agric Environ.* 8: 614-615.
  12. Soltani, M. (2002) *Salmonid diseases.* (1<sup>st</sup> ed.) University of Tehran press. Tehran, Iran.
  13. St-Hilaire, S., Ribble, C.S., LaPatra, S.E., Chartrand, S., Kent, M.L. (2001) Infectious hematopoietic necrosis virus antibody profiles in naturally and experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*, *Dis Aquat Org.* 46:7-14.
  14. Sweeney, A., Blake, S., Singer, J.T., Nicholson, B.L. (1997) Detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by polymerase chain reaction (PCR). In: *New approaches to viral disease of aquatic animals.* Inui, Y., Winton, J. (eds.), National Research Institute of Aquaculture. Nansei, Japan. p. 42-47.
  15. Wang, W., Lee, J., Shieh, M., Wi, Y., Huang, C., Chien, M. (1996) Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from an outbreak in Taiwan by serological and polymerase chain reaction assays. *Dis Aquat Org.* 26: 237-239.
  16. Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J.T., Nicholson, B.L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J Clin Microbiol.* 37: 4139-4141.
  17. Zargar, A., Soltani, M., Hematzadeh, F., Kazemi, B., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2008) Study on distribution of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in five major provinces producing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Iran by indirect fluorescence antibody (IFAT) and nested-RT-PCR techniques. *J. Vet. Res.* 63: 99-105.

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

Fadaeifard, F.<sup>1\*</sup>, Raissy, M.<sup>1</sup>, Moumeni, M.<sup>2</sup>, Faghani, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departement of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.

<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.

<sup>3</sup>Departement of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran.

(Received 16 June 2012, Accepted 3 September 2012)

## Abstract:

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

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

## Figure Legends and Tabel Captions

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

**Table 2.** Infection of eyed eggs to IHN, VHS, IPN in Chaharmahal va Bakhtyari province.

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

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

