بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در آبزیان: گذشته، حال، آینده

محمد جلیل ذریه زهرا[*1]، محدث قاسمی[2]، امید کوهکن[3]

۱- مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۲- پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، بندر انزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

۳- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا، دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بافت شناسی آبزیان، خرمشهر، ایران، صندوق پستی: ۶۶۹

تاریخ دریافت: ۲۳ فروردین ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۱۰ مرداد ۱۳۹۱

چکیده

بیماری نکروز عصبی ویروسی یک بیماری مهلک به ویژه درماهیان با ارزش اقتصادی است. این بیماری بیش از چهل گونه از ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و حدود هفتاد گونه نیز به صورت حامل، فاقد علایم بالینی ولی دارای ویروس عامل این بیماری هستند. ماهیان مبتلا علایم بالینی از قبیل شنای مارپیچی، شنای نیزه‌ای، کم اشتهایی، تغییر در رنگدانه‌ها، تورم کیسه شنا، برگشتن بر روی پشت وشنای خوابیده بر پشت و خونریزی‌های زیرجلدی را نشان می‌دهند. در مطالعات میکروسکوپیک علایم اصلی یعنی واکوئولاسیون مغز، چشم و نخاع مشاهده می‌گردد در واقع سیستم عصبی مرکزی هدف اصلی این ویروس است. عامل ایجاد کننده این بیماری ویروسی از نوع بتانوداویروس و از خانواده نوداویریده می‌باشد. این خانواده شامل دو جنس است، جنس آلفانوداویروس که نوداویروس خاص حشرات می‌باشد و در حشرات ایجاد بیماری می‌کند. آلفا نودا ویروس همچنین می‌تواند بچه موش و بچه هامسترهای شیرخوار را مبتلاکند و سبب فلج و مرگ در این جانوران شود. جنس بتانوداویروس نیزماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل متعلق به جنس بتانوداویروس ذراتی کوچک به قطر حدود ۲۵ تا ۳۰ نانومتر بدون پوشش و دارای شکل بیست وجهی بوده و ژنوم آن‌ها شامل دو RNA تک رشته‌ای است. این بیماری از سراسر جهان به استثنای قاره آفریقا گزارش شده است. نکروز عصبی ویروسی عمدتاً از طریق انتقال افقی گسترش می‌یابد اما انتقال عمودی آن نیز مطرح است. تاکنون هیچ واکسن تجاری موثری برای مقابله با این بیماری تهیه نشده و عملاً راهی برای درمان آن وجود ندارد ولی آشنایی بیشتر با خصوصیات این بیماری می‌تواند در پیشگیری از انتقال آن مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: ماهی، بیماری نکروز عصبی ویروسی، بتانوداویروس.

* عهده دار مکاتبات (✉). j.zorieh@ifro.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی (VER) (Munday, *et al.,* 1992; OIE, 2006) که همچنین به نام‌های آنسفالوپاتی Seabass و Bellance and) (Gallet de Saint-Aurin, 1988 نکروز عصبی ویروسی (Yoshikoshi and Inoue, 1990) آنسفالومیلیت Turbot (Bloch, *et al.,* 1991) و آنسفالوپاتی ماهی (Comps, *et al.,* 1996) نیز شناخته می‌شود، به شرایط نوروپاتولوژیکی گفته می‌شود که گونه‌های مختلفی از ماهیان مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به وسیله تعداد معدودی از عوامل ویروسی متعلق به خانواده نوداویریده (Nodaviridae) ایجاد می‌شود. بیماری نکروز عصبی ویروسی یا همان آنسفالوپاتی و رتینوپاتی واکوئوله شونده یکی از مهمترین بیماری‌های ماهیان استخوانی در دنیا محسوب می‌گردد، چرا که در بیش از ۴۰ گونه از ماهیان پرورشی و طبیعی از قبیل: طوطی ماهی ژاپنی *Oplegnathus fasciatus*، ماهی بارامونده *Lates calcarifer*، ماهی باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax*، توربوت *Scophthalmus maximus* و ماهی هامور خال قرمز *Epinephelus akaara* ، بروز می‌کند و در سراسر جهان میزان بالایی از مرگ و میر را باعث می‌گردد (جدول ۲). بیماری نکروز عصبی ویروسی به عنوان یک بیماری ویروسی خطرناک بسیاری از بچه ماهیان، ماهیان جوان و در پاره‌ای از موارد ماهیان دریایی بالغ را مبتلا نموده و تقریباً از همه آب‌های سراسر جهان به استثنای قاره افریقا گزارش شده است (Maltese and Bovo, 2007). علاوه بر این که این بیماری در چهل گونه از ماهیان مختلف آب‌های جهان گزارش شده است، بیش از هفتاد گونه از ماهیان نیز بدون این که علائم بالینی خاصی را از خود نشان دهند تحت تأثیر این ویروس قرار می‌گیرند (Hick, *et al*., 2010).

این بیماری اولین بار درسال ۱۹۸۸ توسط Bellance و Gallet de Saint-Aurin متعاقب یک تلفات سنگین در لارو باس دریایی در جزایر مارتینیک فرانسه گزارش شد. البته Glazebrook و Campbell یک سال قبل از آن‌ها در سال ۱۹۸۷ تلفات گروهی را در ماهی بارامونده (*Lates calcarifer*) گزارش کرده بودند که دارای آسیب‌های مغزی بوده‌اند و به احتمال زیاد به دلیل آلودگی به بتانوداویروس بوده است (Maltese and Bovo, 2007). از آن زمان به بعد این بیماری در بیش از ۴۰ گونه مختلف و در مناطق جغرافیایی متفاوت دیده شده است. طبق اعلام دفتر بین المللی بیماری‌های واگیردام (OIE) (۲۰۰۶) کلیه تلفات دسته جمعی که در آن ماهیان مبتلا علایم عصبی نشان دهند و همراه با ذرات ویروسی کوچک متعلق به خانواده نوداویریده باشند می‌بایست به عنوان یک بیماری واحد تحت عنوان آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی (VER) یا نکروز عصبی ویروسی (VNN) در نظر گرفته شوند.

سبب شناسی (Aetiology)

۱- ویژگی‌های ژنتیکی و ریخت شناسی

بیماری VNN/VER می‌تواند توسط عوامل ویروسی محدودی ایجاد شود، که قبلاً به عنوان اعضایی از خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae) شناخته می‌شدند (Glazebrook, *et al.,* 1990; Bloch, *et al.,* 1991; Breuil, *et al.,* 1991) که می‌توانند صدمات عصبی مشابهی را در گونه‌های

Archive of SID
www.SID.ir

مختلف ایجاد کنند. در ادامه با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی اسیدنوکلئیک و پروتئین های ساختمانی به دست آمده از ویروس‌های جداشده از لاروهای ماهی striped jack (*Pseudocaranx dentex*) توسط (Mori, *et al.,* 1992) و بافت مغزی که از ماهیان گونه *Dicentrarchus labrax* و *Lates calcarifer* توسط (Comps, *et al.,* 1994) استخراج شده بودند بعدها این ویروس‌ها را جزو خانواده نوداویریده معرفی کردند (Schneemann, *et al.,* 2005).

این خانواده شامل دو جنس است: جنس آلفانوداویروس که به شکل اولیه آلوده کننده حشرات می‌باشند، از قبیل Nodamura Virus (NOV)، Blackbeetle Virus (BBV)، Flock House Virus (FHV) و BoolarraVirus (BOV) (Schneemann and Marshall, 1998) و جنس بتانودا ویروس (Betanodaviridae) که شامل ۴ گونه است که ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Carstens, *et al.,* 2000; Schneemann, *et al.,* 2005). عوامل متعلق به جنس بتانوداویروس ذراتی کوچک به قطر حدود ۲۵ تا ۳۰ نانومتر بدون پوشش و دارای شکل بیست وجهی است (Glazebrook, *et al.,* 1990; Bloch, *et al.,* 1991). ژنوم آن‌ها شامل دو RNA تک رشته‌ای و RNA بدون پلی آدنیلات است. RNA1 با وزن (KB) ۳/۱ ، یک پروتئین غیرساختمانی به وزن ۱۰۰کیلودالتون به نام پروتئینA را کد می‌کند که بخش ویروسی RNA پلیمراز وابسته به RNA را می‌سازد. RNA2 با وزن (KB) ۱/۴ که حاوی توالی ORF می‌باشد پروتئین کپسید را با وزن ۴۴×۱۰^{۳} دالتون می‌سازد (Mori, *et al.,* 1992; Comps, *et al.,* 1994). البته در آلفا نوداویروس علاوه بر RNA1 و RNA2 یک RNA سومی نیز وجود دارد که به آن RNA3 می‌گویند که اخیراً برای بتانوداویروس نیز تعریف شده است. قابل ذکر است که در مورد آلفا نودا ویروس مولکول RNA3 تنها در کشت‌های سلولی آلوده به ویروس مشاهده می‌شود و به احتمال زیاد در طول همانند سازی از RNA1 سنتز شده است (Iwamoto, *et al.,* 2001a; Sommerset and Nerland, 2004). مقایسه بین ژن پروتئین کپسید درSJNNV با چهار آلفا نوداویروس مجزا شباهت کمی را نشان داد (کمتر از ۳۰٪). نتایج مشابهی نیز با مقایسه توالی آمینو اسیدی پروتئین کپسید به دست آمده است (کمتر از ۱۱٪) (Nishizawa, *et al.,* 1995b; Nagai and Nishizawa, 1999).

این در حالی است که شباهت بین بتانوداویروس-های مختلف با خودشان، هم در مورد نوکلئوتیدها (۷۵٪) و هم در مورد آمینواسیدهای کپسید (۸۰٪) بسیار بالاست (Nishizawa, *et al.,*1995b; Sideris, *et al.,* 1997). این نتایج به وضوح نشان می‌دهد نوداویروس-های حشرات و ماهیان شباهت کمی به هم دارند و از طرف دیگر مؤکد بر شباهت بتانوداویروس‌ها باهم است.

اخیراً مطالعات سرولوژیک ۳ سروتیپ را در بتانوداویروس‌ها معرفی کرده است، سروتیپ A وB به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های SJNNV و TPNNV می‌باشد. سروتیپ C مربوط به ژنوتیپ‌های RJNNV و BFNNV است که مبین شباهت ساختاری بالای توالی RNA2 در این دو ژنوتیپ است (Mori, *et al.,* 2003).

۲- ویژگی‌های طبقه‌بندی و بررسی‌های فیلوژنتیک

بتانوداویروس‌هایی که تاکنون جداسازی شده است، به نام گونه‌ای که از آن جداشده‌اند شناخته

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شوند که حروف اختصاری EV (ویروس انسفالوپاتی)، NNV (ویروس نکروز عصبی) و NV (نوداویروس) در ادامه آن‌ها قرار می‌گیرد.

هرچند هر یک از گونه‌های میزبان معمولاً تنها با یک عامل ویروسی منفرد که خاص آن گونه است آلوده می‌گردد (Species-specific)، با این حال مواردی نیز گزارش شده است که از یک گونه منفرد انواع متفاوت ویروسی جدا شده است، این حالت درگونه *Dicentrarchus labrax* مشاهده گردیده است (Thiery, *et al.,* 1999a).

بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک روی ناحیه متغیر (Variable region) در ویروس T4 که پروتئین کپسیدی را کد می‌کند، بتانوداویروس به ۴ ژنوتیپ دسته‌بندی می‌شود که در واقع ۴ گونه‌ای است که به طور رسمی تاکنون اعلام شده است: TPNNV، SJNNV ، BFNNV ، RGNNV (Nishizawa, *et al.,* 1995b, 1997; Dalla Valle, *et al.,* 2001; Thiery, *et al.,* 2004) (جدول ۱).

ذرات جداشده متعلق به ژنوتیپ‌های SJNNV و TPNNV به ترتیب از گونه striped jack (*Pseudocaranx dentex*) و (*Takifugu rubripes*) Tiger puffer به دست آمده‌اند. ژنوتیپ RGNNV حروف اختصاری هستند که از نام انگلیسی *Epineohlus akaara* یعنی Red spotted grouper بر گرفته شده‌اند و از تعداد زیادی از ماهیان گونه‌های آب گرم جدا شده‌اند (Skliris, *et al.,* 2001). در حالی که ویروس‌های جداشده از ماهیان آب سرد اغلب در گروه BFNNV جای می‌گیرند که اولین بار در ماهی گونه (*Verasper moseri*) دیده شده است (Dannevig, *et al.,* 2000; Grotmol, *et al.,* 2000; Starkey, *et al.,* 2001). البته یک استثنا نیز وجود دارد که در آن ویروس از Turbot (TNV) جداشده است و به عنوان ژنوتیپ پنجم در نظر گرفته می‌شود اما رسمیت ندارد (Johansen, *et al.,* 2004b). بررسی فیلوژنتیک روی ژنوتیپ‌های شناخته شده، نشان دهنده این موضوع است که ژنوتیپ‌هایTPNNV و SJNNV از ژنوتیپ‌های RGNNV و BFNNV مشتق شده‌اند. به بیانی، این اشتقاق با سرعت $۲/۶\times۱۰^{-۳}$ ایجاد نوکلئوتید بر جایگاه در سال صورت پذیرفته است. تاریخ این اشتقاق به ۱۰۰ الی ۱۵۰ سال پیش باز می‌گردد. به علاوه یک اشتقاق کوچک و جزیی در هر دسته طی ۱۰ سال گذشته رخ داده است که ممکن است به دلیل رشد فعالیت‌های آبزی‌پروری باشد (Nishizawa, *et al.,* 1997) کلیه ویروس‌های جداشده در ژاپن که متعلق به ژنوتیپ RGNNV می‌باشد به عنوان مشتقاتی از سویه اجدادی در نظر گرفته می‌شود که از کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) منشأ گرفته است. پراکنش گسترده این گونه در ژاپن خود مؤید این موضوع است که به دلیل سهولت در پرورش، این ویروس در سطح گسترده و به تعداد زیاد در مناطق جغرافیایی وسیعی وجود دارد. از سوی دیگر باید در نظر داشت که ذرات دیگری متعلق به ژنوتیپ TPNNV که تفاوت زیادی با RGNNV دارند از گونه‌های مشابه جداسازی شده است، لذا این فرضیه مطرح شده است که کفشک ماهی ژاپنی در پراکنش بیماری نکروز عصبی ویروسی نقش کلیدی دارد (Nishizawa, *et al.,* 1997).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: تقسیم بندی و پراکنش ژنوتیپ‌های گوناگون جنس بتانودا ویروس‌ها و جایگاه میزبانی آنان
(Schneemann, *et al.,* 2005)

ژنوتیپ‌های فرعی جنس بتانوداویروس	ژنوتیپ‌های اصلی جنس بتانوداویروس
Atlantic cod nervous necrosis virus (ACNNV) Atlantic halibut nodavirus (AHNV) Dicentrarchus labrax encephalitis virus (DIEV) Dragon grouper nervous necrosis virus (DGNNV) Greasy grouper nervous necrosis virus (GGNNV) Grouper nervous necrosis virus (GNNV) Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV) Lates calcarifer encephalitis virus (LcEV) Malabaricus grouper nervous necrosis virus (MGNNV) Seabass nervous necrosis virus (SBNNV) Umbrina cirrosa nodavirus (UCNV)	Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) Red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV)

با توجه به توزیع جغرافیایی این بیماری، برای ویروس‌های متعلق به ژنوتیپ‌های BFNNV و RGNNV اروپا به عنوان منشأ اصلی آن مطرح شده است، در حالی که برای ژنوتیپ TPNNV و SJNNV اقیانوس آرام به عنوان منشأ قطعی آن شناخته شده است. ویروس‌های متعلق به ژنوتیپ‌های SJNNV احتمالاً از طریق تجارت ماهیان زینتی به اروپا منتقل شده و در آن جا به تدریج با گونه‌های بومی آب‌های سرد وگرم سازگاری یافته است (Aspehaugh, *et al.,* 1999). این نکته نیز بدیهی است که پس از سازگاری با محیط و گونه‌های جدید، این ذرات ویروسی مجدداً از طریق تجارت آزاد ماهیان و از طریق ماهی whitefish به اقیانوس آرام برگشته است (Aspehaugh, *et al.,* 1999; Skliris, *et al.,* 2001).

این منطقی است که بپذیریم تکامل مولکولی در بتانودا ویروس‌ها به طور چشمگیری تحت تأثیر دمایی قرار دارد که گونه‌های مختلف در مناطق متفاوت در آن دما زندگی می‌کنند (Totland, *et al.,* 1999). این فرضیه با شناسایی دو ژنوتیپ مجزا تأیید شد: اولین ژنوتیپ توانایی ایجاد بیماری در Seabass پرورش یافته در سواحل اقیانوس آرام را داراست، دومین ژنوتیپ نیز باعث ایجاد بیماری در گونه‌های مشابه اما پرورش یافته در مدیترانه می‌شود که به طور چشمگیری دما در آن جا بالاتر است (Thiery, *et al.,* 1999a). به علاوه شباهت ژنتیکی بین ویروس‌های جداشده از ماهیان بومی آب‌های آسیا و استرالیا با ویروس‌های جداشده از ماهیان منطقه مدیترانه پیشنهادکننده یک تکامل یا همگرایی همسو بین مناطق جغرافیایی متفاوت است تا این که بیان کننده یک تبادلات مستمر باشد (Dalla Valle, *et al.,* 2001).

فرضیه دیگر در رابطه با شیوع و انتشار بتانوداویروس‌ها، مصرف غذای زنده را مدنظر قرار می‌دهد از قبیل: *Artemia salina* ، *Tigriopus japonicus* و *Acetesinte medius* (Chi, *et al.,*

Archive of SID

www.SID.ir

2003). این ارگانیسم‌ها به عنوان ناقل عمل کرده و بیماری را به راحتی به فواصل دور منتقل می‌کنند.

این امر شناسایی ویروس‌های بسیار مشابه را در میزبان‌های بسیار دور توجیه می‌کند. مثلاً ویروس‌های به دست آمده از ماهی *Hippoglossus hippoglossus* در نروژ با ویروس‌های به دست آمده از ماهی *Verasper moseri* درکشور ژاپن مشابه بودند (Grotmol, *et al.,* 1995; Muroga, 1995).

با مطالعه فیلوژنتیکی روی ۹ سویه ویروس به دست آمده در منطقه مدیترانه که توسط Dalla Valle و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت پذیرفته است فرضیه وجود یک سویه اجدادی مشترک مطرح شد که در *Dicentrarchus labrax* به عنوان میزبان وجود داشته است.

میزبان‌ها و توزیع جغرافیایی

VER/VNN در بسیاری از مناطق جغرافیایی دنیا مشاهده شده است و برای صنعت آبزی پروری به عنوان یک تهدید جدی مطرح است به خصوص در مناطقی که گونه‌های حساس‌تر پرورش داده می‌شوند و تاکنون توسط محققین زیادی در دنیا مورد بررسی قرار گرفته است (Le Breton, *et al.,* 1997; Munday and Nakai, 1997; Munday, *et al.,* 2002). تا امروزاین بیماری در بیش از ۴۰ گونه متعلق به گونه‌های مختلف آبزیان مشاهده شده است (جدول ۲) و این تعداد احتمالاً با گسترش فعالیت‌های آبزی‌پروری و خصوصاً ماهیان زینتی افزایش خواهد یافت (Gomez, *et al.,* 2006). همچنین بسیاری از گونه‌های مقاوم همچون Seabream (*Sparus aurata*) که تاکنون در برابراین بیماری مقاوم به نظر می رسیدند، در حال حاضر به دلیل شیوع نگران کننده این بیماری به طور جدی مورد تهدید می‌باشند (نتایج منتشر نشده Beraldo, *et al.,* 2007; Bovo, *et al.,*) از سوی دیگر تاکنون موارد بسیار زیادی از این بیماری در جنوب شرق آسیا گزارش شده است:

(Yoshikoshi and Inoue, 1990; Mori, *et al.,* 1991; Nakai, *et al.,* 1994; Nguyen, *et al.,* 1994; Chua, *et al.,* 1995; Danayadol, *et al.,* 1995; Muroga, 1995; Fukuda, *et al.,* 1996; Jung, *et al.,* 1996; Chi, *et al.,*1997; Sohn and Park, 1998; Zafran, *et al.,* 1998; Bondad-Reantaso, *et al.,* 2000; Zafran, *et al.,* 2000; Chi, *et al.,* 2001; Lai, *et al.,* 2001b; Oh, *et al.,* 2002; Maeno, *et al.,* 2002; Chi, *et al.,* 2003; Hegde, *et al.,* 2003)

در منطقه مدیترانه نیز تاکنون موارد متعددی از این بیماری گزارش شده است:

(Breuil, *et al.,* 1991; Bovo, *et al.,* 1996; Sweetman, *et al.,* 1996; Le Breton, *et al.,* 1997; Pavoletti, *et al.,* 1998; Thiery, *et al.,* 1999a; Athanassopoulou, *et al.,* 2003, 2004; Maltese, *et al.,* 2005)

همچنین در دریای شمال (Bloch, *et al.,* 1991; Grotmol, *et al.,* 1995). مواردی از ابتلا به بتانوداویروس اخیراً در سواحل آمریکا (Starkey, *et al.,* 2000; 2001) آمریکای شمالی (Curtis, *et al.,* 2001; Barker, *et al.,* 2002; Gagnè, *et al.,* 2004) و اخیرا نیز از جمهوری اسلامی ایران (Zorriehzahra, *et al.,* 2005) و کشور هند (Azad, *et al.,* 2005) این بیماری مشاهده و گزارش شده است. علی‌رغم این که این بیماری اکثراً در ماهیان دریایی دیده شده است، با این وجود گونه‌های خاصی از ماهیان آب شیرین نیز به این بیماری مبتلا شده‌اند، از قبیل:

Anguilla anguilla (Chi, *et al.,* 2003)،

Poecilia reticulate (Hedge, *et al.,* 2003)،

Archive of SID
www.SID.ir

Acipenser ،(Chi, *et al.,* 2003) *Parasilurus asotus* *gueldenstaedti* توسط (Athanassopoulou, *et al.,* 2004) از کشور یونان،*Tandanus tandanus* و *Oxyeleotris lineolatus* توسط (Munday, *et al.,* 2002).

این بیماری همچنین به صورت تجربی در تیلاپیای موزامبیکی (*Oreochromis mossambicus*) ایجاد شده است (Skliris and Richards, 1999b) اخیراً نیز بیماری در ماهیان جوان و بالغ (*Oryzias latipes*) Medaka ایجاد شده است (Furusawa, *et al.,* 2006) که این موضوع به منزله اثبات عدم دخالت عامل شوری (میزان نمک) به عنوان عامل تعیین کننده در وقوع بیماری قلمداد می‌گردد.

در جدول ۲ و زیر نویس منابع آن، کلیه گونه‌های مبتلا شده به این بیماری، منطقه جغرافیایی وقوع بیماری و نام محققینی که برای اولین بار این بیماری را در منطقه و گونه مورد نظر گزارش کرده‌اند به همراه سال گزارش وقوع بیماری به تفصیل آمده است.

شباهت بالای مشاهده شده بین ویروس‌های جداشده از گونه *Epinephelus taurina* یعنی سروتایپ (ETNNV) که جدا شده از یک گونه ماهی آب شور است و ویروس جدا شده ازماهی گوپی *Poecilia reticulate* یعنی سروتایپ (GNNV) که جدا شده از یک ماهی زینتی آب شیرین است مؤید منشأ دریایی آلودگی‌های ویروسی مشاهده شده در گونه‌های آب شیرین است (Hedge, *et al.,* 2003). شواهد مزبور این نگرانی را به وجود می‌آورد که ممکن است اکثر ماهیان با ارزش آب‌های شیرین حتی اگر به صورت تصادفی در معرض عامل بیماری قرار گیرند به این بیماری دچارگردند.

خانواده نوداویریده علاوه بر عواملی که ماهیان و حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهند شامل ویروس‌هایی است که در صدف‌ها نیز آلودگی‌های شدیدی ایجاد می‌کنند. گزارشاتی از تایوان، چین و مجمع الجزایر فرانسوی West indies نیز رسیده است که موفق به تشخیص عامل ویروسی در میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* شده‌اند که تلفات بالایی در اثر بیماری دم سفید (White tail) داشته‌اند (Arcier, *et al.,* 1999) در سال ۲۰۰۳، Widada و همکاران این عامل ویروسی را متعلق به خانواده نوداویریده معرفی کردند.

تلاش برای ایجاد بیماری در میگوهای *Penaeus indicus* ، *Penaeus japonicus* و *Penaeus monodon* نتایج منفی در برداشت (Sudhakaran, *et al.,* 2006). لذا مطرح شده است که این گونه میگوها نسبت به آلودگی ایجادشده توسط نوداویروس جداشده از *Macrobrachium rosenbergii* مقاوم می‌باشند.

در سال ۲۰۰۷ نیز Pantoja و همکاران یک عامل نوداویروسی را در خرچنگ‌ها در برزیل کشف کردند که به طور موقت آن را LvNV (*Litopenaeus vannamei nodavirus*) نامیدند.

لیست ماهیانی که دچار این بیماری شده‌اند و یا نسبت به این بیماری حساس می‌باشند، همانند برخی ماهیان گونه‌های زینتی مدام در حال افزایش است (Gomez, *et al.,* 2006).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: گونه‌های ماهیان مبتلا شده به بیماری نکروز عصبی ویروسی و منطقه جغرافیایی وقوع بیماری (Matlese and Bovo, 2007)

راسته	گونه ماهی	نواحی جغرافیائی
Anguilliformes	*Anguilla anguilla* (European eel)	Taiwan[1]
Gadiformes	*Gadus morhua* (Atlantic cod)	UK[2], Canada[3], USA[4], Norway[49]
	Melanogrammus aeglefinus (Haddock)	Canada[5]
Perciformes	*Lates calcarifer* (Barramundi, Asian seabass)	Australia[6], China[7], Indonesia[8], Malaysia[9],
	Lateolabrax japonicus (Japanese seabass)	Japan[15]
	Dicentrarchus labrax (European seabass)	Caribbean[16], France[17], Greece[18], Italy[19], Malta[20],
	E. akaara (Red spotted grouper)	Japan[21], Taiwan[22]
	E. awoara (Yellow grouper)	Taiwan[23]
	E. coioides (Orange-spotted grouper)	Philippines[10], Taiwan[1]
	E. fuscoguttatus (Brown-marbled grouper)	Taiwan[24]
	E. malabaricus (Malabar grouper)	Thailand[25]
	E. marginatus (Dusky grouper)	Mediterranean[19]
	E. moara (Kelp grouper)	Japan[26]
	E. septemfasciatus (Convict grouper)	Japan[27], Korea[28]
	E. tauvina (Greasy grouper)	Malaysia[29], Philippines[29], Singapore[30]
	Chromileptes altivelis (Humpback grouper)	Indonesia[31], Taiwan[1]
	Latris lineata (Striped trumpeter)	Australia[7]
	Pseudocaranx dentex (Striped jack)	Japan[32]
	Seriola dumerili (Greater amberjack)	Japan[33]
	Trachinotus blochii (Snub nose pompano)	Taiwan[1]
	Trachinotus falcatus (Yellow-wax pompano)	Taiwan[1]
	Sparus aurata (Gilthead seabream)	France[34], Italy[35]
	Sciaenops ocellatus (Red drum)	Korea[36],
	Umbrina cirrosa (Shi drum)	Italy[37], France[38]
	Atractoscion nobilis (White weakfish)	USA[39]
	Oplegnathus fasciatus (Japanese parrotfish)	Japan[40]
	Oplegnathus punctatus (Rock porgy)	Japan[32]
	Oxyeleotris lineolata (Sleepy cod)	Australia[7]
	Rachycentron canadum (Cobia)	Taiwan[1]
	Liza aurata (Golden grey mullet)	Iran[41]
	Lutjanus erythropterus (Crimson snapper)	Taiwan[1]
Pleuronectiformes	*Verasper moseri* (Barfin flounder)	Japan[33]
	Hippoglossus hippoglossus (Atlantic halibut)	Norway[42], UK[43]
	Paralichthys olivaceus (Japanese flounder)	Japan[44]
	Scophthalmus maximus (Turbot)	Norway[45]
	Solea solea (Dover sole)	UK[2]
Tetraodontiformes	*Takifugu rubripes* (Japanese puffer fish)	Japan[27]
Siluriformes	*Parasilurus asotus* (Chinese catfish)	Taiwan[24]
	Tandanus tandanus (Australian catfish)	Australia[7]
Cyprinodontiformes	*Poecilia reticulata* (Guppy)	Singapore[46]
Scorpaeniformes	*Sebastes oblongus* (Oblong rockfish)	Korea[47]
Acipenseriformes	*Acipensergueldenstaedti* (Russian sturgeon)	Greece[48]

References: (1) Chi, *et al.*, 2001; (2) Starkey, *et al.*, 2001; (3) Johnson, *et al.*, 2001; (4) Johnson, *et al.*, 2002; (5) Gagnè, *et al.*, 2004; (6) Glazebrook and Campbell, 1987; (7) Munday, *et al.*, 2002; (8) Zafran, *et al.*, 1998; (9) Awang, 1987; (10) Maeno, *et al.*, 2002; (11) Chang, *et al.*, 1997; (12) Renault, *et al.*, 1991; (14) Glazebrook, *et al.*, 1990; (14) Azad, *et al.*, 2005; (15) Jung, *et al.*, 1996; (16) Bellance and Gallet de Saint-Aurin, 1988; (17) Breuil, *et al.*, 1991; (18) Le Breton, *et al.*, 1997; (19) Bovo, *et al.*, 1999a; (20) Skliris, *et al.*, 2001; (21) Mori, *et al.*, 1991; (22) Chi, *et al.*, 1997; (23) Lai, *et al.*, 2001b; (24) Chi, *et al.*, 2003; (25) Danayadol, *et al.*, 1995; (26) Nakai, *et al.*, 1994; (27) Fukuda, *et al.*, 1996; (28) Sohn and Park, 1998; (29) Bondad-Reantaso, *et al.*, 2000; (30) Chua, *et al.*, 1995; (31) Zafran, *et al.*, 2000; (32) Mori, *et al.*, 1992; (33) Muroga, 1995; (34) Comps and Raymond, 1996; (35) Dalla Valle, *et al.*, 2000; (36) Oh, *et al.*, 2002; (37) Pavoletti, *et al.*, 1998; (38) Comps, *et al.*, 1996; (39) Curtis, *et al.*, 2001; (40) Yoshikoshi and Inoue, 1990; (41) Zorriehzahra, *et al.*, 2005; (42) Grotmol, *et al.*, 1995; (43) Starkey, *et al.*, 2000; (44) Nguyen, *et al.*, 1994; (45) Bloch, *et al.*, 1991; (46) Hedge, *et al.*, 2003; (47) Kim, *et al.*, 2001; (48) Athanossopoulou, *et al.*, 2004; (49) Pantel, *et al.*, 2007.

www.SID.ir

علایم بالینی

علایم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی همچون شنای غیرطبیعی مارپیچی، چرخشی یا خوابیده بر آب برپشت (Belly up) و بروز حالات واکوئولاسیون در بافت عصبی مرکزی از موارد شاخص این بیماری است. معمولاً واکوئوله شدن در لایه گرانولار (هسته دار) بافت شبکیه چشم نیز به چشم می‌خورد. ضایعات به طور معمول در ماهیان جوان با شدت بیشتری مشهود است. معمولاً با شروع اولین علائم بالینی، مرگ و میر قابل توجهی در ماهیان رخ می‌دهد و به طور معمول به حدود ۱۰۰٪ نیز می‌رسد (Hegde, *et al*., 2002).

علایم بالینی نتیجه آسیب‌هایی است که در سیستم عصبی مرکزی و شبکیه چشم ماهیان مبتلا رخ می‌دهد. علایم اولیه با نوعی شنای نامتعارف آغاز می‌گردد که بسته به سن و گونه ماهی به شکل‌های مختلف آشکار می‌شود. در صورت ابتلای بیماری، ماهی مبتلا ممکن است به صورت مستقیم و سریع نزدیک سطح آب شنا کند. ماهیان بیمار به طور متناوب پس از مدتی که به صورت بی حال بسر برده و حرکات ناهماهنگ دارند، حرکات چرخشی گسترده‌ای را در هنگام شنا از خود نشان می‌دهند که در این حالت به سرعت به دور خود می‌چرخند. برخی از ماهیان در حالت ساکن و بدون حرکت با وضعیت غیرطبیعی قرار می‌گیرند به این صورت که ماهی به صورت عمودی در آب قرار گرفته و سر ویا باله دمی ماهی از آب بیرون قرار می‌گیرد که خاص این بیماری است (Maltese and Bovo,2007). یکی دیگر از رفتارهای شنای نامتعارف در این بیماری حرکات نیزه مانند (Darting) است بدین صورت که ماهی مبتلا بدون حرکت و خوابیده بر پهلو به سطح آب آمده و ناگهان به صورت شیرجه مانند به طرف اعماق حرکت می‌کند. در این حالت ماهیان مبتلا غالباً با سرعت در مسیر مستقیم و نزدیک به سطح شنا می‌کنند، به طوری که قادر به توقف خود نبوده با شدت زیادی به جداره‌های تانک برخورد کرده و آرواره‌های آن‌ها دچار صدمات و تروما می‌شود.

ماهیان پهن اغلب علایم کمتری نشان می‌دهند و ماهیان مبتلا به حالت طولی باقی می‌مانند اما بدن این ماهیان خمیده شده و سر و دم آن‌ها برآمده می‌شود. گاهی اوقات نیز به صورت وارونه (belly up) در کف تانک قرار می‌گیرند. قبل از اینکه ماهیان به کف تانک بیافتند برای مدت کوتاهی می‌لرزند، و حرکات لرزشی نشان می‌دهند که تداعی کننده ریزش برگ درختان در فصل پاییز است (Maltese and Bovo, 2007).

در رنگدانه‌های پوستی ماهیان مبتلا نیز اغلب تغییراتی دیده می‌شود. این تغییر در لارو ماهی (Barramundi) و لارو ماهی *Hippoglossus hippoglossus* به سمت بی‌رنگ و کم رنگ شدن و بالعکس در ماهیان جوان از نوع (*H.hippoglossus*)، باس دریایی اروپایی (*D.labrax*)، توربوت (*S.maximus*) و *Epinephelus spp* در جهت تیره ترشدن رنگدانه‌های بدن (پیگمانتاسیون) است که به طور معمول از باله دمی ماهیان مبتلا آغاز می‌شود (Glazebrook, *et al*., 1990; Munday, *et al*., 1992). این که علایم و مرگ و میر اغلب در چه مرحله‌ای از زندگی مشاهده می‌شود در ارتباط مستقیم با چگونگی ابتلا به بیماری و گونه مبتلا می‌باشد (Munday and Nakai, 1997). اگر چه بالاترین میزان تلفات اغلب در لاروها و بچه ماهیان مشاهده می‌شود، با این حال تلفات شدیدی نیز در ماهیان بالغ گزارش شده

Archive of SID

www.SID.ir

است: *Pseudocaranx dentex* (Arimoto, *et al.,* 1993; Mushiake, *et al.,* 1994; Nguyen, *et al.,* 1997)، *Epinephelus septemfasciatus* (Fukuda, *et al.,* 1996; Tanaka, *et al.,* 1998) و *Dicentrarchus labrax* (Bovo, *et al.,* 1996; Le Breton, *et al.,* 1997).

تلفات شدیدی نیز در ماهیان بالغ halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) و نیز Atlantic cod (*Gadus morhua*) در نروژ گزارش شده است (Aspehaug, *et al.,* 1999; Pantel, *et al.,* 2007)، البته در این مورد ابتلا به بیماری در مراحل لاروی و ماهیان جوان اتفاق افتاده است و تلفات در ماهیان بالغ رخ داده است (Grotmol, 2000; Johnson, *et al.,* 2001). در دریای خزر نیز اگرچه سن ابتلا مشخص نیست لیکن تلفات در ماهیان بالغ از گونه‌های (*Liza aurata*) و (*Lisa salience*) به کرات مشاهده شده است (Zorriehzahra, *et al.,*2005).

اولین گزارش‌ها از این بیماری حاکی از ارتباط تنگاتنگ بین ضایعات آسیب شناسی و علایم بالینی با دمای بالا می‌باشد به طوری که در ابتدا Bellance و Gallet de Saint Aurin در سال ۱۹۸۸ آن را بیماری تابستانه (Summer disease) نامیدند. این نکته بدیهی است که بروز علایم بالینی به طور چشمگیری تحت تأثیر دماست (Arimoto, *et al*., 1994). اما مشاهدات بعدی نشان داد که آلودگی طبیعی و بیماری می‌تواند در طیف وسیع دمایی رخ دهد. بیشتر ماهیان مبتلا متعلق به گونه‌های آب گرم بوده و بیماری در دمای بالا خود را نشان می‌دهد، از جمله *E. malabaricus* که تلفات در آن در دمای بین ۲۸ تا ۳۰ درجه رخ می‌دهد (Danayadol, *et al*., 1995) و یا لاروهای *P. dentex* که مرگ آن‌ها در دمای بین ۲۰ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد (Arimoto, *et al*., 1994).

Fukuda و همکارانش در سال ۱۹۹۶ اعلام کردند که زمانی که بیماری در ماهیان آب گرم بروز می‌یابد، افزایش دما به عنوان یک عامل مساعد کننده نقش اساسی ایفا می‌نماید. زمانی که بیماری در ماهیان سردآبی از قبیل *Hippoglossus hippoglossus* و *Verasper moseri* بروز می‌کند علایم در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد قابل مشاهده است (Grotmol, *et al.,* 1995).

با تزریق درون عضلانی هموژن مغزی و چشمی ماهیان مبتلا به بیماری به ماهیان سالم *Epinephelus septemfasciatus* و *Epinephelus akaara* نتیجه گرفته شد که هم بروز علایم بیماری و هم ایجاد تلفات به شدت تحت تأثیر دمای آب است، چون در دمای بالاتر از ۲۸ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان تلفات در کوتاهترین زمان پس از تزریق هموژن مشاهده گردید (Tanaka, *et al.,* 1998).

در Seabass اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) علایم بالینی که در دمای بالاتر از ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی گراد به وضوح قابل تشخیص هستند، با کاهش دما به حدود ۱۸ الی ۲۲ درجه به سرعت کاهش می‌یابد (Sweetman, *et al.,* 1996; Bovo, *et al.,* 1999a) نکروز عصبی ویروسی در دماهای پایین‌تر حدود ۱۴ تا ۱۵ درجه به ندرت اتفاق می‌افتد که در این حالت علایم بسیار اندک و یا فاقد علایم بالینی می‌باشد (Galeotti, *et al.,* 1999; Borghesan, *et al.,* 2003) مشاهدات مشابهی نیز در *Epinephelus septemfasciatus* گزارش شده است (Tanaka, *et al.,* 1998). همچنین بیماری حتی می‌تواند در صورتی

Archive of SID

www.SID.ir

که دمای آب به صورت روزانه در حال نوسان باشد نیز رخ دهد یعنی ویروس توان سازش با این شرایط را نیز دارد (Fukuda, unpublished data).

Totland و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که یک سویه ژاپنی این ویروس که قادر است در لارو *Pseudocaranx dentex*، که یک گونه آب گرم است، ایجاد بیماری کند، قادر به تکثیر در Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)، که یک گونه آب سرد است، نمی‌باشد. از طرف دیگر گونه اخیر (Atlantic halibut) می‌تواند توسط یک سویه از ویروس که در نروژ جداشده است آلوده شود، این در حالی است که این سویه بنا به دلایلی نامشخص در لارو *Pseudocaranx dentex* قادر به ایجاد بیماری نیست.

ضایعات آناتوموپاتولوژیک

اتساع بیش ازحد کیسه شنا در گونه‌های مختلف در مرحله لاروی دیده شده است (Breuil, *et al.*, 1991; Munday, *et al.*, 1992) در ماهیان کفال بالغ مبتلای دریای خزر نیز اتساع شدید کیسه شنا مکرر گزارش شده است (Zorriehzahra *et al.*, 2005). در برخی موارد نواحی تیره رنگ در پوست سر، از جمله ناحیه مشرف به مغز و سرپوش آبششی، همراه با آسیب‌های آرواره‌ها، سرخی نواحی اطراف سر با منشأ احتمالی ناشی از ضربات وارده در اثر شنای (Darting) نیز مشاهده می‌شود (Bovo, *et al.*, 1996). (شکل ۱).

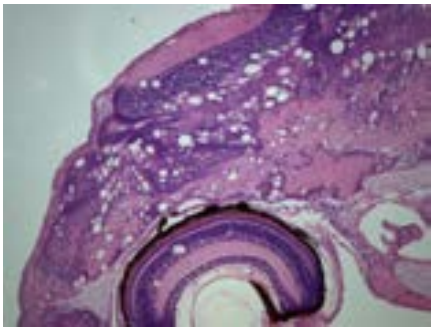
شکل ۱: ضایعات ناشی از ضربات وارده به آرواره ها در ماهی European seabass (*Dicentrarchus labrax*) ناشی از بتانوداویروس (شکل از: Dr.G.Bovo)

ضایعات هیستو پاتولوژیک

شاخص‌ترین ضایعات آسیب شناسی در ماهیان مبتلا در گونه‌های مختلف، واکوئولاسیون و نکروز سلول‌های عصبی است. آسیب‌ها ممکن است در بخش‌های مختلف مغز (مغز پیشین، مغز میانی و مغز پسین) و بصل النخاع (شکل ۲) طناب نخاعی و لایه گرانولار (هسته‌دار) شبکیه چشم (شکل ۳) سلول‌های مخروطی و استوانه‌ای و بافت پوششی اطراف لایه زایا مشاهده شود (Munday, *et al.*, 1992; Grotmol, *et al.*, 1995; Comps and Raymond, 1996; Grove *et al.*, 2003) در ماهی *Hippoglossus hippoglossus* (Atlantic halibut) که طی بیماری VER دچارتلفات شدیدی شده بودند، علاوه بر صدمات واکوئولاسیون که شاخص این بیماری هستند، صدمات جدار داخل قلبی (اندوکاردیال) نیز مشاهده شد.

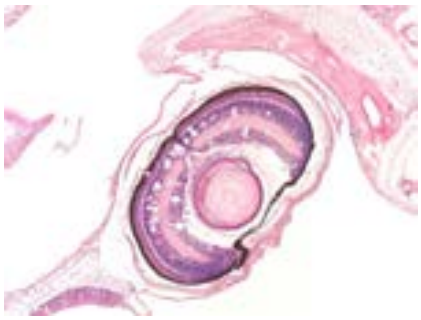
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: ضایعات واکوئولاسیون در قسمت های مختلف مغز
لارو European seabass
(*Dicentrarchus labrax*)
(شکل از: Dr. Franco Mutinelli)

ضایعات واکوئولاسیون موجود در CNS به طور عمده در ناحیه Optic tectum مغز رخ می‌دهد (Grotmol, *et al.,* 1997b)، در حالی که طبق مطالعات Le Breton و همکارانش (۱۹۹۷) در Seabass ضایعات بیشتر در ناحیه تلنسفالون، دینسفالون و مخچه دیده می‌شود. تعداد و اندازه واکوئول‌های ایجاد شده به گونه ماهی مبتلا و خصوصاً به سن ماهی بستگی دارد. بیشتر صدمات در لاروها و ماهیان جوان در سیستم عصبی مرکزی (CNS) دیده می‌شود (Glazebrook, *et al.,* 1990; Breuil, *et al.,* 1991).



شکل ۳: ضایعات واکوئولاسیون در لایه گرانولار (هسته دار)
شبکیه چشم لارو European seabass
(*Dicentrarchus labrax)*
(شکل از : Dr. Franco Mutinelli)

عموماً گرانول‌های درون سلولی و برون سلولی بیشترین تراکم را در ناحیه متنسفالون و لایه گرانولار (دانه‌دار) شبکیه چشم دارند. با این وجود در طناب نخاعی خصوصاً در محدوده روی کیسه شنا نیز حضور پررنگ دارند (Galeotti, *et al.,* 1999) صدمات همچنین در گانگلیون‌های نخاعی در Oplegnathus fasciatus نیز مشاهده شده است (Yoshikoshi and Inoue, 1990) صدمات مشاهده شده شامل پیگنوز سلولی و بازوفیلی شدن (Yoshikoshi and Inoue, 1990) پیگنوز کانونی، نرون‌های کاریورکتیک karyorectic و تراوش سلول‌های مونونوکلئار (Grotmol, *et al.,*1995) می‌باشد. همچنین سیتوپلاسم بازوفیلیک در سلول‌های عصبی ماهیانی همچون *Lates calcarifer* و *Dicentrarchus labrax* و *Epinephelus malabricus* دیده شده است (Glazebrook, *et al.,* 1990; Breuil, *et al.,* 1991; Boonyaratpalin, *et al.,* 1996) صدمات عروق خونی مغز نیز گزارش شده است (Le Breton, *et al.,* 1997). در Seabass بالغ، این بیماری صدمات هیستوپاتولوژیک و علایم قطعی کمتری نشان می‌دهد (Galeotti, *et al.,* 1999) صدمات در ماهیان بالغ شدت کمتری نسبت به لاروها و ماهیان جوان نشان می‌دهد به طوری که همیشه واکوئول‌های اختصاصی به راحتی قابل شناسایی نیست. صدمات شبکیه چشم در ماهیان بالغ بیشتر مشاهده می‌شود. می‌توان گفت که التهاب به عنوان پاسخ ثانویه به این بیماری ممکن است بروز کند. واکوئولاسیون در بخش میانی لوله گوارش (Hind gut) به همراه شکل‌گیری قطرات هیالین و اپیتلیوم شاخی شده نیز گزارش شده است (Glazebrook, *et al.,* 1990). تغییرات آسیب شناسی

Archive of SID
www.SID.ir

که گاهی اوقات به طور همزمان با ابتلا به نوداویروس در کبد، کلیه، قلب، روده و عضلات اسکلتی نیز دیده می‌شود، لزوماً مرتبط به آلودگی بتانوداویروس نیست (Johansen, *et al.,* 2004a).

آلودگی تحت کلینیکی Subclinical

حتی اگر در روند انتقال این بیماری، حاملین فاقد نشان و علایم بیماری را به عنوان منبع اصلی آلودگی در نظر بگیریم، مکانیسم‌هایی که در مقاومت آن‌ها و در کنترل همانندسازی ویروس‌ها نقش دارند، به اندازه کافی شناخته نشده‌اند. طبق مطالعات Johansen و همکاران (۲۰۰۴) که روی پیشرفت بیماری با سروتایپ AHNNV مطالعه کرده‌اند، با استفاده از روش‌هایی همچون ایمونوهیستوشیمی (IHC)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و کشت سلولی موفق به شناسایی ویروس در سیستم عصبی مرکزی ماهیان زنده باقی مانده از تلفات شدند. این نتایج نشان داد حداقل در *Hyppoglossus hippoglossus* مدت زمان ناقل بودن ممکن است بسیار طولانی باشد. شناسایی ویروس هم در دستگاه تناسلی ماهیان مولد نر و ماده، وهم در تخم‌های ماهیان در گونه‌های مختلف، این فرضیه را تأیید می‌کند که بیماری به صورت عمودی (Vertical) از والدین آلوده به بچه ماهیان منتقل می‌شود (Arimoto, *et al.,* 1992; Mushiake, *et al.,* 1994; Nishizawa, *et al.,* 1996; De Mas, *et al.,* 1998; Dalla Valle, *et al.,* 2000) از طرفی Nguyen و همکاران (۱۹۹۷) به روش پادتن‌های درخشان یا روش ایمونوفلئوروسنت (IFAT) Immunofluorescent antibody test توانستند وجود ویروس را در غدد جنسی (گنادها) و سایر اندام‌ها از جمله روده، معده، کلیه و کبد در Striped jack *(Pseudocaranx dentex)* تأیید کنند. این در حالی بود که آزمایش مزبور بر روی CNS کاملاً منفی بود.

در *Hippoglossus hippoglossus* ذرات ویروسی در داخل سلول‌های عصبی، آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها، میکروگلیوسیت‌ها، ماکروفاژها، لمفوسیت‌ها، اپیتلیوم و عروق، و همچنین در آندوتلیوم و مزوتلیوم قلب و آندوکارد ماهیان مبتلا مشاهده شد (Grotmol, *et al.,* 1997b). همچنین ذرات شبه نوداویروس در قسمت جدار داخلی قلب (آندوکارد) ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) Atlantic salmon که مبتلا به سندروم میوکارد (CMS) بوده‌اند نیز مشاهده شده است (Grotmol, *et al.,* 1997a). Dalla Vallet و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده ازروش تشخیصی RT-PCR موفق به کشف ژنوم بتانوداویروس در *Sciaena umbra* و *Sparus aurata* شدند که علایم بیماری را از خود بروز نداده بودند. در مورد این ماهیان نتایج مثبت دیگری نیز توسط محققان مختلف در دنیا به دست آمده است (Comps and Raymond, 1996; Dalla Valle, *et al.,* 2000; Castric, *et al.,* 2001) که نشان‌دهنده این است که این گونه می‌تواند نقش کلیدی در اپیدمیولوژی بیماری VER در مدیترانه، جایی که گونه *Dicentrarchus labrax* هدف اصلی این ویروس است، داشته باشد. مطالعات تجربی توسط سایر محققین در دنیا نشان داد که گونه‌های دیگر نیز می‌توانند به عنوان حاملین فاقد علایم بالینی عمل کنند (Glazebrook, 1995; Skliris and Richards, 1999a; Johansen, *et al.,* 2003) لذا با مطالعه‌ای که در کانادا صورت گرفت، مشخص شد که جمعیت‌های خاصی از ماهیان وحشی، مشکوک به

Archive of SID

www.SID.ir

حامل بودن این ویروس می‌باشند. در حقیقت با بررسی‌های به عمل آمده به روش PCR مشخص شد که این ویروس در ۰/۲۳ درصد از گونه‌های وحشی *Pleuronectes americanus* وجود دارد (Barker, *et al.,* 2002). در ژاپن نتایج به دست آمده از مطالعه بر روی ۳۰ گونه مختلف، تهیه شده از بنادر Yashima (حوزه kagawa) و Tamanoura (حوزه Nagasaki)، نشان داد که اکثر گونه‌های وحشی و پرورشی در این مناطق به این ویروس آلوده‌اند، حتی با این که در لحظه صید هیچگونه علایم بالینی نداشته‌اند (Gomez, *et al.,* 2004). در حوزه مدیترانه نیز وجود آلودگی VER در گونه‌های خاص به اثبات رسیده است (Ciulli, *et al.,* 2006b) به نظر می‌رسد آلودگی در کفال قرمز (*Mullus barbatus barbatus*) در این منطقه بالا باشد چرا که میزان شیوع این ویروس در این ماهیان حدود ۲۸/۸٪ به دست آمده است (Maltese and Bovo, 2007).

انتقال بیماری

طبق مشاهدات مختلف در مزارع پرورش ماهی و همچنین نتایج به دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی که توسط محققان مختلف در شرایط کنترل شده صورت پذیرفته است (Glazebrook, *et al.,* 1990; Mori, *et al.,* 1991; Arimoto, *et al.,* 1993; Nguyen, *et al.,* 1994; 1996; Thiery, *et al.,* 1997; Grotmol, *et al.,* 1999; Peducasse, *et al.,* 1999; Totland, *et al.,* 1999) مسیر انتقال افقی بیماری (Horizontal) کاملاً تأیید شده است. این در حالی است که انتقال عمودی (Vertical) نیز در انتقال این بیماری برای برخی گونه‌ها مطرح شده است (Nguyen, *et al.,* 1997; Breuil, *et al.,* 2002; Johansen, *et al.,* 2002).

تمایل بافتی (Tissue tropism)

ضایعات هیستوپاتولوژیک که در ارتباط با آلودگی بتانوداویروس بوده‌اند به وضوح نشان می‌دهد که این ویروس به بافت عصبی تمایل اولیه بسیاری دارند (نوروتروپیسم) و دارای جایگاه تکثیر زیادی در CNS و شبکیه چشم می‌باشند. طبق مطالعات پاتوژنتیک که بر روی گونه‌های مختلف در مراحل متفاوتی از زندگی انجام شده است، فرضیات مختلفی در مورد نحوه دست‌یابی ویروس‌ها به جایگاه تکثیر خود پس از ورود به میزبان مطرح شده است. طبق مطالعات Nguyen و همکاران (۱۹۹۶) یکی از جایگاه‌های آغازین همانندسازی این ویروس در لارو *Pseudocaranx dentex* طناب نخاعی می‌باشد، سپس ویروس می‌تواند از این محل به مغز و در نهایت از طریق عصب بینایی به شبکیه چشم مهاجرت کند. این محقق با روش FAT موفق به شناسایی پادگن ویروسی در گناد، روده، معده، کلیه و کبد ماهیان بالغ و حامل گردید. اما آزمایش مزبور در CNS و بافت شبکیه منفی بود. این امر نشانگر تفاوت عمده بین ماهیان حامل و ماهیان مبتلای دارای علایم بالینی می‌باشد. وجود ویروس در احشای ماهیان، فرضیه آلودگی بچه ماهیان را از طریق انتقال ذرات ویروسی در تولیدات جنسی و روده‌ای را تقویت می‌کند (Nguyen, *et al.,*1997) همچنین شناسایی پادگن ویروسی در پیاز بویایی، احتمال ورود ویروس از طریق حفره بینی را مطرح می‌نماید (Mladineo, 2003). فرضیه دیگر اپیتلیوم مطبق بخش ابتدایی لوله گوارش (Foregut) را به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

جایگاه اولیه تکثیر این ویروس معرفی می‌کند. این منطقه به راحتی در دسترس ویروس‌های احتمالی موجود در آب و غذا خواهد بود و از این ناحیه ویروس‌ها به واسطه اعصاب محیطی و جمجمه‌ای (Cranial) به آسانی به مغز و چشم‌ها دست می‌یابند (Munday, *et al.,* 1992; Grotmol, *et al.,* 1999). طبق مطالعات Peducasse و همکاران (۱۹۹۹) آبشش‌ها و پوست ناحیه اطراف خطوط جانبی محل اصلی ورود ویروس به بدن ماهیان می‌باشد.

انتقال افقی Horizontal

مطالعات متعددی که بر روی لاروها و ماهیان جوان در گونه‌های مختلف انجام شده است، مسیر انتقال افقی بیماری را تأیید می‌کند. در برخی موارد که به طور همزمان شرایط محیطی مورد نیاز برای پیشرفت بیماریزایی از قبیل دما، سن ماهی و غیره مورد بررسی قرار گرفته است، نشان داده شده است که بیماری از طریق یک لارو مبتلا به یک لارو سالم در *Lates calcarifer* منتقل می‌شود (Glazebrook, *et al.,* 1990). در ایجاد بیماری به صورت مصنوعی، پس از آلوده‌سازی ماهیان از طریق تزریق درون صفاقی و روش حمام (Bath) در ماهیان جوان *Epinephelus akaara*، بیماری ۱۰ الی ۱۴ روز پس از مواجه سازی ظاهر گردید. در این مورد نیز همان علایم هیستوپاتولوژیکی که در آلودگی طبیعی دیده می‌شود، مشاهده گردید لیکن میزان تلفات کمتر بود (Mori, *et al.,* 1991).

در گونه *Pseudocaranx dentex* از طریق حمام دادن لارو سالم و همچنین همزیستی با لاروهای مبتلا موفق به ایجاد و انتقال بیماری شده‌اند (Arimoto, *et al.,* 1993; Nguyen, *et al.,* 1996). همچنین با روش‌های مشابه بیماری VER به ماهیان جوان گونه *Paralichthys olivaceus* نیز منتقل شده است (Nguyen, *et al.,* 1994). در *Epinephelus malabaricus* بیماری از طریق ویروس آلوده به روش تزریق درون صفاقی ایجاد شده است. علایم بیماری ایجاد شده مشابه علایم بیماری است که به صورت طبیعی بروز می‌کند. در این حال میزان تلفات ۴۰ تا ۶۰ درصد است. در حالی که در شرایط استرس بالا، بروز مرحله حاد این بیماری طبیعی است اما در این گونه، بیماری مرحله حاد را چه در بیماری طبیعی و چه در شکل تجربی طی نمی‌کند (Boonyaratpalin, *et al.,* 1996).

Thiery و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که پس از تلقیح درون صفاقی هموژن مغزی ماهیان مبتلا، به ماهیان جوان سالم *Dicentrarchus labrax* میزان مرگ و میر ۲۸٪ بوده است. Peducasse و همکارانش (۱۹۹۹) ثابت کردند که آلودگی ایجاد شده درگونه *Dicentrarchus labrax* از طریق دهان و یا حمام و یا همزیستی با ماهیان مبتلا، ایجاد یک بیماری تحت حاد با اختلالات عصبی کم و تلفات پایین می‌کند. طبق بررسی‌های ایشان اختلالات عصبی شدید و حالت حاد بیماری که همراه با تلفات بالاست پس از تزریق درون صفاقی مشاهده می‌شود. که در این حالت دوز ویروس و میزان بیماریزایی سویه تزریقی، دو عامل کلیدی در ایجاد بیماری هستند.

انتقال عمودی Vertical

طبق تحقیقات برخی محققان، انتقال عمودی یکی از راه‌های گسترش بیماری در جمعیت‌های پرورشی است (Arimoto, *et al.,* 1992; Yoshimizu, *et al.,*

Archive of SID

www.SID.ir

1997; Breuil, *et al.,* 2002) در مورد انتقال عمودی با تردید می‌توان سخن گفت. اطلاعات اپیدمیولوژیک شیوع بالایی از بیماری را در مراحل ابتدایی لاروی و ماهیان جوان نشان می‌دهد که قابل تفسیر نیستند (Breuil, *et al.,* 1991; Arimoto, *et al.,* 1992; Comps, *et al.,* 1996; Yoshimizu, *et al.,* 1997; Grotmol and Totland, 2000) فرضیه انتقال عمودی به خاطر مشاهده عوامل ویروسی در گنادها و تخم‌های بارور در ماهی *Pseudocaranx dentex* مطرح شد که با روش‌های تشخیصی همچون ELISA (Arimoto, *et al.,* 1992) و RT-PCR (Mushiake, *et al.,* 1994; Nishizawa, *et al.,* 1996; Dalla Valle, *et al.,* 2000; Breuil, *et al.,* 2002) و IFAT (Nguyen, *et al.,* 1996, 1997) به اثبات رسید. از طرف دیگر ویروس در تخم‌ها و لاروهایی مشاهده شد که والدین آن‌ها به صورت تجربی آلوده شده بودند (Breuil, *et al.,* 2002). این اطلاعات نشاندهنده این است که بیماری می‌بایست از والدین به بچه ماهیان منتقل شده باشد، اما هنوز مشخص نشده است که آیا انتقال درون تخمدانی (Intra-ovarian) رخ می‌دهد و یا این که یک آلودگی خارجی رخ داده و عامل ویروسی به لاروهای کوچک در هنگام هچری منتقل می‌شود.

سایر راه‌های انتقال

در سال ۱۹۹۸ Skliris و Richards آرتمیا *Artemia salina* و روتیفر *Brachionus plicatilis* را به عنوان منبع آلودگی طبیعی به نوداویروس‌ها مطرح کردند. نتایج منفی حاصل از کشت هموژن بی‌مهرگان آلوده درتیره سلولی SSN-1 نشان دادکه خطر موجود در این موارد تنها در حد انتقال مکانیکی در اثر آلودگی سطحی می‌باشد. Chi و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که رژیم غذایی مرکب از *Artemia salina* ، *Tigriopus japonicas* و *Acetesinte medius* ،که ویروس از آن‌ها جداسازی شده بود، می‌تواند به عنوان منبعی از آلودگی به این بیماری مطرح باشد لذا این ترکیبات نقش کلیدی در انتقال بیماری دارند. تغذیه از طریق ماهیان خام، احتمالی دیگر برای انتقال بیماری می‌باشد. عملی که بیشتر در تغذیه مولدین به کار می‌رود (Mori, *et al.,* 2005). همچنین همجنس خواری و کانی بالیسم به عنوان یک مسیر رایج انتقال بیماری در طبیعت مطرح می‌باشد.

پاسخ ایمنی

مطالعات انجام شده و اطلاعات به دست آمده درباره پاسخ ایمنی در ماهیان مبتلا به VER/VNN متأسفانه بسیار محدود است. بیماری اغلب زود ظاهر می‌شود، به ویژه درمرحله اولیه لاروی، که این حالت با تلفات بالایی همراه خواهد بودکه می‌توان آن را به نقص در سیستم ایمنی بچه ماهیان حساس نسبت داد که به طور کامل تکامل نیافته است. در عوض ماهیان بالغ پاسخ مناسبی به بیماری و آلودگی می‌دهند، با این حال نقص جدی در سیستم ایمنی ماهیان بالغ نیز باعث ایجاد علائم آشکاری از این بیماری در ماهیان مبتلا می‌شود (Arimoto, *et al.,* 1993; Mushiake, *et al.,* 1994; Bovo, *et al.,* 1996; Fukuda, *et al.,* 1996; Le Breton, *et al.,* 1997; Nguyen, *et al.,* 1997; Tanaka, *et al.,* 1998; Aspehaug, *et al.,* 1999) در ماهی *Hippoglossus hippoglossus* ثابت شده است که ماهیانی که پس از ابتلا نمی‌میرند و زنده می‌مانند می‌توانند برای مدت نسبتاً طولانی به عنوان حامل ویروس عمل کنند (Johansen, *et al.,* 2004a). در برخی موارد، حتی با این که برخی علایم اختصاصی

Archive of SID
www.SID.ir

هنوز وجود دارد، ویروس قابل مشاهده و شناسایی نیست، دلیل اصلی آن به خاطر غلظت پایین ویروس در بدن ماهی است، که پس از بهبود ماهی کاملاً ناپدید می‌شوند. مطالعات اولیه با ایجاد آلودگی تجربی در ماهیان حساس در شرایط آزمایشگاهی و تولید واکسن‌های نوترکیب و یا استفاده از ویروس‌های غیرفعال شده منجر به شناسایی پادتن‌های اختصاصی در ماهیان مقاوم به عفونت در این بیماری گردیده است (Fukuda, *et al.,* 1996). طبق مطالعات Grove و همکاران (۲۰۰۳) پاسخ ایمنی و تولید پادتن‌ها تنها زمانی مشاهده می‌شود، که ایجاد بیماری تجربی از طریق تلقیح درون صفاقی (IP) ایجاد شود و نه از طریق غوطه‌ورسازی (Immersion). با این حال پاسخ ایمنی که به دنبال شیوع طبیعی بیماری رخ می‌دهد ممکن است به مدت یک سال و حتی بیشتر در بالاترین حد خود باقی بماند (Grove, *et al.,* 2003).

در مطالعه‌ای بر روی ترکیبات ایمنی در ماهی Atlantic halibut *(Hippoglossus hippoglossus)* ، پس از تلقیح به روش داخل صفاقی به وسیله سروتایپ AHNNV، پاسخ ایمنی مشخص در پلاسمای خون ماهیان بعد از ۱۸روز آغاز شد و تا روز ۵۶ بعد از تلقیح افزایش یافت. بنابر این نتایج می‌توان گفت که وجود ویروس در CNS ماهیان مبتلا باعث تولید پادتن‌های اختصاصی به وسیله سلول‌های خونی در پلاسمای خون می‌شود (Grove, *et al.,* 2006).

روش‌های تشخیص بیماری

بیماری نکروز عصبی ویروسی برای مدت‌های طولانی بر اساس علایم بالینی اختصاصی خود مرتبط با ضایعات اختصاصی واکوئولاسیون در بافت (CNS) مغز و نخاع و بافت شبکیه چشم ماهیان مبتلا شناسایی می‌شد. فراهم شدن تیره سلولی SSN-1 که نسبت به تکثیر بتانوداویروس حساس می‌باشد، روش تشخیصی معتبری را ایجاد کرد (Frerichs, *et al.,* 1996) بعدها تیره‌های سلولی بیشتری توسط محققین برای اهداف تشخیص و تحقیقی در این بیماری به دست آمدند (Chi, *et al.,* 1999a; Watanabe and Yoshimizu, 1999; Iwamoto, *et al.,* 2000; Chang, *et al.,* 2001; Lai, *et al.,* 2001a, 2003).

از طرف دیگر در اوایل سال ۱۹۹۰ روش‌های مولکولی نیز توسعه یافت. طبق کتاب راهنمای تشخیص بیماری‌های سازمان جهانی بیماری‌های واگیر دام OIE (۲۰۰۶) تشخیص ماهیان مبتلای فاقد علایم بالینی، می‌بایست از طریق جداسازی عامل بیماری در کشت‌های سلولی SSN-1 و E-11 و تایید شناسایی آن‌ها به روش‌های IFAT و RT-PCR انجام پذیرد. در مواردی که بیماری از نظر بالینی مشکوک است شناسایی ویروس علاوه بر روش کشت سلولی با روش‌های IHC ، IFAT یا RT-PCR نیز امکان‌پذیر می‌باشد. بر این اساس و پیشنهادات موجود در کتاب سازمان OIE چندین روش تشخیصی متفاوت در ادامه بیان خواهد شد.

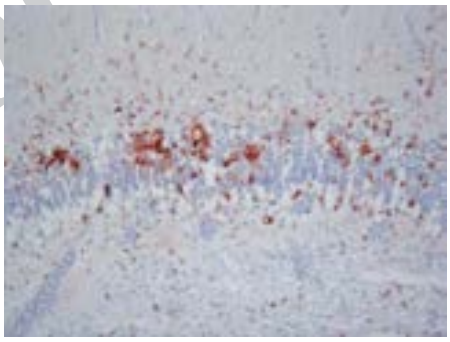
هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی

متأسفانه به دو دلیل روش هیستوپاتولوژیک به تنهایی یک روش تشخیصی معتبر نمی‌باشد. اول این که مواردی گزارش شده است که در آن‌ها بچه ماهیان مبتلا، دارای ضایعات اختصاصی بسیار کم و یا فاقد علایم بالینی هستند (Bovo, *et al.,* 1996; Galeotti, *et al.,* 1999) و ثانیاً ضایعات واکوئولاسیون حتی اگر

Archive of SID

www.SID.ir

همراه با بیماری باشند، علی رغم آن که در موارد مشابه می‌تواند تعیین‌کننده باشد باز هم نمی‌تواند برای این بیماری به عنوان ضایعات پاتوگنومیک در نظر گرفته شود. به عبارت دیگر، روش IHC به عنوان یک روش تشخیصی و تکمیلی در این بیماری در نظر گرفته می‌شود (Mutinelli, *et al.,* 1998; Grove, *et al.,* 2003; Johansen, *et al.,* 2004b) در حقیقت روش IHC اجازه شناسایی پادگن‌های ویروسی موجود در سیستوپلاسم سلول‌های دژنره شده (شکل ۴) و ضایعات اسفنجی شکل CNS و شبکیه چشم را می‌دهد. IHC را می‌توان برای شناسایی آلودگی مورد نظر به کار برد.



شکل ۴: واکنش مثبت در آزمایش IHC نسبت به بتانوداویروس در مقاطع بافت مغز در ماهی European seabass (*Dicentrarchus labrax*)
(شکل از: Dr. Marta Vascellari)

این روش در مورد بچه ماهیان جوان با وزن حدود ۳ گرم به کار رفته است. این ماهیان فاقد علایم عصبی و ضایعات هیستوپاتولوژیک بوده اما آزمایش IHC در آن‌ها مثبت بوده است (Galeotti, *et al.,* 1999) پاسخ مثبت IHC در غیاب ضایعات هیستوپاتولوژیک می‌تواند هم به دلیل محدودیت در بیماری‌زایی ویروس مربوطه باشد وهم به دلیل آن که ماهی در دوره نقاهت بیماری و دفع ویروس به سر می‌برد. در حالت دوم سلول‌های محدودی مثبت هستند که نشان دهنده حضور بقایای ویروسی در بدن ماهیان زنده، پس از طی مرحله حاد بیماری می‌باشد (Galeotti, *et al.,* 1999).

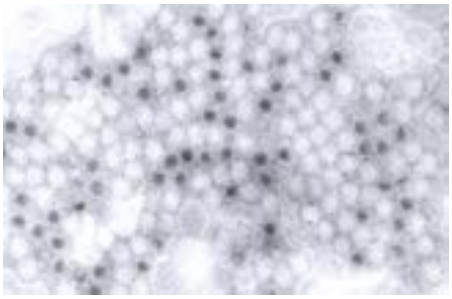
زمانی که در روش IHC تنها تعداد محدودی از سلول‌ها در مقاطع مغزی واکنش مثبت نشان می‌دهند، جستجو در چشم‌ها و به خصوص بافت شبکیه که به عنوان مکان فراوانی حضور پادگن‌های ویروسی معرفی شده است، احتمالاً جواب بهتری خواهد داد (Galeotti, *et al.,* 1999; Mladineo, 2003).

میکروسکوپ الکترونی

به دلیل اندازه کوچک بتانوداویروس (۲۵ الی ۳۰ نانومتر) مشاهده مستقیم آن توسط میکروسکوپ الکترونی خصوصاً در غلظت‌های پایین ویروس ممکن است دشوار باشد، در ماهیان مبتلای دارای علایم بالینی، به خصوص اگر لاروها و ماهیان جوان مبتلا باشند، به دلیل تراکم بالای ذرات ویروسی در بافت، تشخیص آن‌ها آسان‌تر است. در مطالعه با EM، ویریون‌ها می‌توانند به صورت آزاد در سیتوپلاسم حضور داشته باشند، و یا این که به غشاهای شبکه آندوپلاسمیک متصل شده باشند. غشای تیغه‌های داخلی میتوکندری به طور کامل از بین می‌رود، با این حال غشای سیتوزولی میتوکندری دست نخورده باقی می‌ماند. در برخی موارد ذرات ویروسی بصورت تجمعات پاراکریستالین (para-crystalline) دیده می‌شود (شکل ۵) (Glazebrook, *et al.,* 1990; Bloch, *et al.,* 1991; Breuil, *et al.,* 1991; Boonyaratpalin, *et al.,* 1996; Grotmol, *et al.,* 1997b)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵: شناسائی ذرات بتا نودا ویروس به وسیله میکروسکوپ الکترونی در بافت مغز ماهی European seabass (*Dicentrarchus labrax*)
(شکل از : Dr. Montesi Francesco)

ویریون‌ها در سلول‌های عصبی، آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها و میکروگلیوسیت‌ها قابل مشاهده می‌باشد (Yoshikoshi and Inoue, 1990; Grotmol, *et al.,* 1997b) در ماهی Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*) علاوه بر موارد فوق، ذرات ویروسی در سلول‌های آندوتلیال، لمفوسیت‌های مجاور آندوکاردیوم، میوسیت‌های کاردیال و در سلول‌های اپی کاردیال نیز دیده می‌شوند (Grotmol, *et al.,* 1997a).

جداسازی ویروس از طریق کشت سلولی

کشت سلولی مهمترین روش موجود برای جداسازی، تکثیر و شناسایی و تشخیص ویروس‌های جانوری محسوب می‌شود. تا سال ۱۹۹۳ بیش از ۱۵۰ تیره سلولی (Fryer and Lannan, 1994) برای شناسایی و جداسازی ویروس‌های بیماری زا در ماهیان به کار رفته است، که از این میان بخش عمده آن‌ها از بافت ماهیان آب شیرین و بخش اندکی از ماهیان آب شور مشتق شده است. بلافاصله پس از بروز بیماری VNN/VER تلاش‌های متعددی برای جداسازی ویروس با استفاده از تیره‌های سلولی موجود به عمل آمد (Watanabe and Yoshimuzu, 1999) اما هیچکدام موفق نبود.

در سال ۱۹۹۶ Frerichs و همکاران موفق به تکثیر این ویروس در یک تیره سلولی شدند که در سال ۱۹۹۱ از ماهیان جوان (*Ophiocephalus striatus*) Striped snakehead مشتق شده بود. این تیره سلولی SSN-1 نامیده شد. نگهداری از این سلول‌ها بسیار دشوار است و از طرف دیگر به راحتی توسط تیپ C رتروویروس SnRV آلوده می‌شود (Frerichs, *et al.,* 1991; Hart, *et al.,* 1996) به منظور بهبود کاربرد این تیره سلولی، شش جمعیت سلولی از آن ایجاد شد (A6، B7، C3، E2، E9، E11) و سپس میزان حساسیت آن‌ها نسبت به ۴ ژنوتیپ رسمی بتانوداویروس ارزیابی گردید که احتمالاً از طریق القای تولید گیرنده اختصاصی غشایی، که باعث چسبیدن نوداویروس به سلول‌ها می‌شود، این ارزیابی صورت گرفت (Iwamoto, *et al.,* 2000).

تقسیم‌بندی تیره‌های سلولی مزبور در جدول ۳ به شرح ذیل مشخص شده است:

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: فهرست تیره‌های سلولی مورد استفاده در تشخیص بیماری VNN

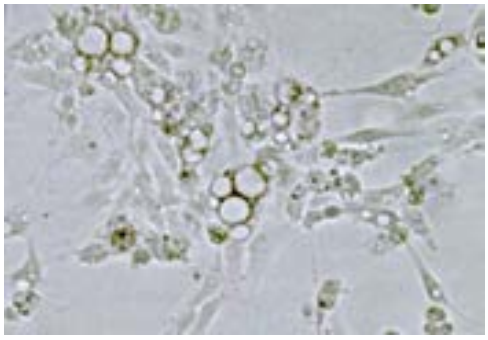
نام تیره سلولی	مشتق شده از بافت ماهی	نام ابداع کننده اولیه یا محقق سازنده
SSN-1	Striped snakehead *(Ophiocephalus striatus)*	(Frerichs, *et al.,*1996)
GF-1	بافت باله ماهی *Epinephelus coioides*	(Chi, *et al.,* 1999a; 1999b)
SF	مشتق شده از لارو ماهی *Lates calcarifer*	(Chang, *et al.,* 2001)
GB	منشأ بافت مغزی ماهی *E. awoara*	(Lai, *et al.,* 2001b; 2003)
TF	مشتق شده ازماهی *Scophthalmus maximus*	(Aranguren, *et al.,* 2002)
GS	منشأ بافت طحال ماهی *E. coioides*	(Qin, *et al.,* 2006)
BB	بافت مغزی ماهی باراموندی *(Lates calcarifer)*	(Chi, *et al.,* 2005)

اخیراً تیره سلولی آخر به نام BB از بافت مغزی ماهی باراموندی (*Lates calcarifer*) مشتق شده است که استعداد زیادی به جهت آلودگی توسط عوامل ویروسی ایجادکننده VER دارد. این تیره سلولی می‌تواند ارایه کننده یک مدل معتبر برای مطالعه مکانیسم‌های آلودگی و تکثیر ویروس هم در شرایط in vivo و هم در شرایط in vitro باشد (Chi, *et al.,* 2005). اطلاعات بیشتری نیز درخصوص تکثیر سویه‌های نوداویروس جداشده از Seabass، در ۳ تیره سلولی ماهیان (SBL، RTG-2، BF-2) و یک تیره سلولی پستانداران (Cos1) به دست آمده است (Delsert, *et al.,* 1997b).

ویروس‌ها در تیره‌های سلولی ماهیان نسبت به تیره‌های سلولی پستانداران راحت‌تر رشد می‌کنندکه این امر ثابت می‌کند برخلاف نوداویروس حشرات، بتانوداویروس‌ها توانایی تکثیر در بیشتر کشت‌های سلولی را ندارند. به علاوه با وجود این که نوداویروس حشرات، بافت‌های زیادی را در حشره بیمار آلوده می‌کند، بتانوداویروس تمایل خاصی به سلول‌های عصبی دارد. در سلول‌های SSN-1 اثرات سیتوپاتیک (CPE) روزسوم پس از آلودگی ظاهر می‌شود. این اثرات به صورت واکوئل‌های درون سیتوپلاسمی شروع می‌شود که به صورت غیریکنواخت در سراسر سیتوپلاسم لایه سلولی پراکنده می‌شوند. این واکوئل‌های آغازین پس از گذشت چند ساعت از پاساژ سلولی جدید ایجاد سلول‌های واکوئله می‌کند (شکل ۶). ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، تعداد و اندازه آن‌ها به شدت افزایش می‌یابد و تک لایه سلولی دچار انهدام سلولی شده و در نهایت به طور کامل تخریب می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶: اثرات سیتوپاتیک (CPE) ناشی از بتانوداویروس در تیره سلولی SSN-1
(شکل از: Dr. Montesi Francesco)

مطالعات بعدی نشان داد که سلول‌های SSN-1 می‌تواند برای تمایز ژنوتیپ‌ها ازطریق تفاوت در دمای رشد اپتیموم به کار رود (Totland, *et al.,* 1999). بر اساس اثرات سیتوپاتیک حاصل از ۷۰ دسته ویروس جدا شده از ۳۰ گونه از ماهیان آب شور، در سلول‌های SSN-1 آن‌ها را به ۴ گروه تقسیم کردند (Iwamoto *et al.,* 1999).

گروه اول که شامل ۹ دسته ویروس جداشده می‌باشد، متعلق به ژنوتیپ RGNNV بوده و منشأ آن گونه‌های *E. septemfasciatus* ، *Epinephelus akaara*، *E. mooara*، *E. coioides*، *Dicentrarchus labrax*، *Lates calcarifer*، *Oplegnathus punctatus*، *Paralichthys olivaceus* است. ۳ روز بعد از آلودگی، اثرات سیتوپاتیکی را ایجاد می‌کند که به صورت سلول‌های کروی و دانه‌دار با واکوئول‌های سیتوپلاسمیک ظاهر شده و در روز ششم، سلول‌ها به طور کامل از بین می‌روند.

گروه دوم شامل ذرات ویروسی است که متعلق به ژنوتیپ SJNNV بوده و از ماهی *Pseudocaranx dentex* جداسازی شده است. سلول‌های کروی کوچک، دانه‌دار و با قابلیت انکسار بوده که فاقد هیچگونه واکوئولی نمی‌باشند. گروه سوم شامل یک دسته منفرد از ژنوتیپ TPNNV است که از ماهی *Takifugu rubripes* جدا شده است. گروه چهارم شامل ذرات ویروسی متعلق به ژنوتیپ BFNNV است که ۴ دسته آن از ماهی *Paralichthys olivaceus* ویک دسته آن از ماهی *Gadus macrocephalus* و یک دسته نیز از ماهی *Hippoglossus hippoglossus* به دست آمده است. که اثرات سیتوپاتیک مشابه با ژنوتیپ RGNNV به وجود می‌آورند، با این تفاوت که این اثرات را در دمای ۲۰ درجه نشان می‌دهند و در دماهای بالاتر، اثرات سیتوپاتیکی قابل تشخیص نخواهد بود. به علاوه تفاوت در مورفولوژی این اثرات، به دلیل تفاوت در دمای اپتیموم رشد در سویه‌های مختلف است که بستگی به ژنوتیپ آن‌ها دارد. دمای اپتیموم رشد برای ژنوتیپ‌های مختلف شامل:
BFNNV=۱۵–۲۰؛ TPNNV=۲۰؛ SJNNV=۲۰–۲۵ و RGNNV= ۲۵–۳۰ می‌باشد. این اطلاعات از نقطه نظر اهداف تشخیصی حایز اهمیت است به ویژه در زمانی که یافته‌های اپیدمیولوژیک بیان گر آن است که در یک منطقه ژنوتایپ‌های مختلف ویروسی حضور داشته باشد.

ELISA

محققان مختلف نتایج جالبی در موارد متفاوت از از کاربرد ELISA، که برای تشخیص فعالیت پادتن‌های بتانوداویروس به کار رفته است، گزارش کرده‌اند (Mushiake, *et al.,* 1992, Nishizawa, *et al.,* 1995a; Breuil and Romestad, 1999; Breuil, *et al.,* 2000; Watanabe, *et al.,* 2000; Breuil, *et al.*, 2001; Huang, *et al.,*2001; Husgar, *et al.,* 2001; Lai, *et al.,* 2001a; Grove, *et al.,* 2003) مهمترین اشکال این روش، عدم ارتباط بین تشخیص پادتن‌های

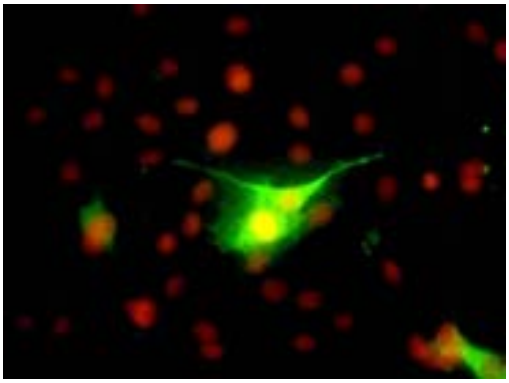
Archive of SID

www.SID.ir

اختصاصی با وضعیت بیماری است که مشاهده می‌شود. در حقیقت ماهی که از نظر وجود ویروس مثبت می‌باشد، ممکن است از نظر تشخیص پادتن‌های (ELISA) منفی باشد (Husgar, *et al.,* 2001) بر طبق نظر محققان آزمایش ELISA ممکن است برای تشخیص ماهیان حامل ویروس در میان مولدین بسیار مفید باشد. در حقیقت با وجود آن که بافت مغزی فاقد این ویروس بوده است، مطالعه روی بافت تخمدان وجود ویروس زیادی را مشخص کرده است (Arimoto, *et al.,* 1992). همچنین روش ELISA برای شناسایی مولدین سرم منفی (seronegative) نیز به کار رفته است (Breuil and Romestand, 1999; Breuil, *et al.,* 2000) طبق تحقیقات Watanabe و همکاران (۲۰۰۰) برای تشخیص ماهیان ناقل در کفشک بارفین (*Verasper moseri*). می‌بایست به صورت همزمان دو آزمایش ELISA و PCR انجام پذیرد، تا هم ژنوم ویروس از طریق بیوپسی تخمدان و هم فعالیت پادتن‌ها در سرم ماهیانی که قبلاً با ویروس مواجهه داده شده‌اند، تشخیص داده شود.

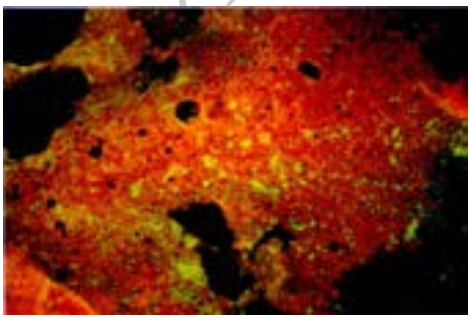
آنتی بادی‌های درخشان

روش IFAT در کتاب راهنمای تشخیص سازمان بیماری‌های واگیردام OIE (۲۰۰۶) نیز پیشنهاد شده است. این روش علاوه بر این که به عنوان روش تأییدکننده در سویه‌های تکثیر یافته در کشت‌های سلولی به کار می‌رود (شکل ۷) همچنین می‌تواند به صورت مستقیم روی مقاطع مغزی ماهیان دارای علایم اختصاصی نیز به کار رود و به عنوان روش تشخیصی معتبر عمل نماید. کاربرد اخیر اجازه می‌دهد تا موارد مشکوک بیماری به سرعت تأیید و یا رد شوند.



شکل ۷: واکنش مثبت آزمایش IFAT
بر روی تیره سلولی SSN-1 آلوده به بتانوداویروس
(شکل از: Dr. Marta Vascellari)

در این روش نمونه‌هایی که علایم بالینی را نشان می‌دهند مورد بررسی قرار می‌گیرند، چرا که حساسیت این روش نسبت به روش‌های مولکولی کمتر است. وجود مقادیر زیادی از ویروس در بافت مغزی، اجازه تشخیص قطعی توسط IFAT را می‌دهد. در این حالت یک روش سریع به کار بردن گستره‌های مغزی (Imprint) می‌باشد (Bovo, *et al.,* 1999b) (شکل ۸). همچنین این روش به طور گسترده برای مطالعه میزان بیماریزایی ویروس پس از آلودگی‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود (Nguyen, *et al.,* 1996, 1997; Tanaka, *et al.*, 1998).



شکل ۸: واکنش مثبت آزمایش IFAT بر روی گستره‌های مغزی (Imprint) ماهی European seabass (*Dicentrarchus labrax*) آلوده به بتانوداویروس
(شکل از: Dr. Marta Vascellari)

Archive of SID
www.SID.ir

روش IFAT در کتاب راهنمای تشخیص بیماری‌های سازمان اپی زئوتیک OIE (۲۰۰۶) نیز پیشنهاد شده است. این روش علاوه بر این که به عنوان روش تأییدکننده در سویه‌های تکثیریافته در کشت‌های سلولی به کار می‌رود، می‌تواند به صورت مستقیم روی مقاطع مغزی ماهیان دارای علایم اختصاصی به کار رود و به عنوان روش تشخیصی نیز عمل نماید (Bovo, *et al*., 1999; Azad, *et al.,* 2006).

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

علیرغم این حقیقت که جداسازی ویروس‌ها در کشت سلولی، به عنوان روش رسمی توسط سازمان OIE اعلام شده و روش طلایی تشخیص ویروس‌های آلوده کننده است، با این حال روش‌های مولکولی از جمله PCR نیز به خاطر حساسیت بالا و اختصاصی عمل کردن بسیار معتبر می‌باشند. این روش‌ها می‌توانند وجود ژنوم ویروسی را در موارد آلودگی‌های مخفی و یا در نمونه‌های با تراکم کم تشخیص دهند (Iwamoto *et al.,* 2001a, 2001b). بیشتر روش‌های PCR بر اساس تکثیر ناحیه کوچکی از RNA2 می‌باشند. این ناحیه پروتئین کپسید ویروس را کد می‌کند (Nishizawa, *et al.,* 1994, 1996; Thiery, *et al.,* 1999b; Dalla Valle, *et al.,* 2000; Grotmol, *et al*., 2000; Skliris, *et al.,*2001; Nagai and Nishizawa, 1999; Tan, *et al*., 2001; Sommerset and Nerland, 2004) همچنین چندین مطالعه بر اساس آنالیز و توالی‌یابی RNA1 نیز صورت پذیرفته است. در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی جدید به منظور افزایش حساسیت و عملکرد اختصاصی توسعه یافته است، از جمله Real-time PCR (Starkey, *et al.,* 2004; Dalla Valle, *et al.,* 2005; Grove, *et al.,* 2005, Ciulli, *et al.,* 2006a).

مدیریت بیماری و روش‌های کنترلی

کمبود اطلاعات اپیدمیولوژیک و دانش محدود ما درباره مکانیسم‌های بیماریزایی این بیماری، یکی از موانع بزرگ بر سر راه کنترل این بیماری محسوب می‌شود. به همین دلیل یک رویکرد چندمنظوره باید اتخاذ شود که ترکیبی از روش‌های دقیق بهداشتی و روش‌های پیشگیرانه است و بایستی شناسایی و جداسازی والدین حاملین ویروس از سایر ماهیان سریع انجام پذیرد. هنگام ورود گونه‌های وحشی به محیط‌های پرورشی باید دقت کافی به عمل آید، چرا که ممکن است بالقوه حامل ویروس باشند. زمانی‌که گونه‌های جدید وارد مزرعه می‌شوند باید در قرنطینه به صورت مجزا از سایرین قرار گیرند و پس از انجام آزمایشات کنترلی وارد محیط تکثیر و پرورش گردند. توسعه روش‌های مولکولی جدید بر پایه Nested و Real-time PCR به طور چشمگیری حساسیت تست‌های تشخیصی را افزایش داده است، که این امر یک ابزار با ارزش را برای کنترل VNN/VER فراهم کرده است (Dalla Valle, *et al.,* 2000; Gomez, *et al.,* 2004; Starkey, *et al.,* 2004; Dalla Valle, *et al.,* 2005; Grove, *et al.,* 2005; Ciulli, *et al.,* 2006a). علاوه بر روش‌های تشخیصی مستقیم، احتمال تشخیص غیرمستقیم به واسطه اندازه‌گیری پادتن‌های اختصاصی نیز مطرح شده است (Arimoto, *et al.,* 1992; Breuil and Romestand, 1999).به موازات کنترل مولدین، کنترل بیماری باید از طریق ایجاد نواحی قرنطینه نیز انجام پذیرد. اتخاذ و به کارگیری روش‌های امنیت زیستی Bio-security شامل ضدعفونی کردن تانک‌ها، چکمه‌ها، تورها وکلیه تجهیزات مورد استفاده دیگر بسیار موثر خواهد بود. در میان مواد مختلف آنتی ویروس، ترکیبات یددار

Archive of SID

www.SID.ir

(یودوفورها) از اهمیت بیشتری برخوردارند وحتی در غلظت کم نیز بر روی این ویروس به خوبی موثرند (25-100ppm) (Arimoto, *et al.,* 1996; Frerichs, *et al.,* 2000; Maltese and Bovo, 2001). همچنین از محلول‌های هیپوکلریت نیز نتیجه رضایت بخش حاصل شده است (Arimoto, *et al.,* 1996; Frerichs, *et al.,* 2000) در حالی که استفاده از فرمالین در مقابله با این ویروس کارایی کمتری دارد (Frerichs, *et al.,* 2000).

علاوه بر اقدامات بهداشتی عمومی که باید صورت پذیرد، مدیریت بهداشتی صحیح کارکنان بخش‌های مختلف مزرعه و همچنین افراد متفرقه که وارد محیط می‌شوند نیز الزامی است. تخم‌ها نیز باید ضدعفونی شوند که بر استفاده از ازن تأکید می‌گردد (Arimoto, *et al.,* 1996; Grotmol and Totland, 2000) استفاده از ازن برای ضدعفونی تخم‌های ماهی Halibut *(Hippoglossus hippoglossus)* که به صورت تجربی آلوده شده بودند، نشان داد که این روش مؤثر بوده و توانایی خنثی کردن کامل ویروس‌های چسبیده به سطح تخم‌ها را دارد. لذا این روش خطر انتقال بیماری به لاروها را کاهش می‌دهد (Grotmol and Totland, 2000). ممکن است این روش همیشه مؤثر نباشد اما حداقل درباره Halibut های مبتلا مؤثراست (مکاتبات شخصی Johansen and Grotmol). موارد مشابهی نیز در مورد تخم‌های *Gadus morhua* و *Scophthalmus maximus* گزارش شده است.

بر اساس مطالعات Munday و همکاران (۲۰۰۲) آب ورودی به هچری‌ها باید توسط ازن تیمار شود و همچنین این آب نباید مجدداً مورد استفاده قرار گیرد. تیمار آب ورودی به مزارع پرورشی، توسط اشعه UV نیز به عنوان یک فرآیند موثر برای کاهش آلودگی‌های محیطی به کار می‌رود (Arimoto, *et al.,* 1996; Frerichs, *et al.,* 2000; Maltese and Bovo, 2001). علیرغم تلاش‌های زیادی که محققین در سال‌های اخیر انجام داده‌اند، هنوز هیچ واکسن تجاری برای این بیماری ساخته نشده است، با این حال نتایج امیدبخشی به دست آمده است (Hugest, *et al.,* 2001; Tanaka, *et al.,* 2001; Yuasa, *et al.,* 2002; Coeurdacier, *et al.,* 2003; Sommerset, *et al.,* 2003; 2005; Thiery, *et al.,* 2006; Lin, *et al.,* 2007) با استفاده از واکسن نوترکیب پروتئین کپسید که از سویه SJNNV به دست آمده است، در ماهیان جوان *Scophthalmus maximus* سطح بالایی از ایمنی را بر علیه هومولوگ ویروسی ایجاد کرد که در مراحل بعدی به ماهی داده شد (Hugest, *et al.,* 2001). به دنبال ۲ تزریق درون عضلانی متوالی در *Epinephelus septemfasciatus*، هر بار ۶۰ µg از پروتئین نوترکیب کپسید که در باکتری E.coli بیان شده است، نتایج مشابهی همراه با تیتربالایی از پادتن مشاهده شد (Tanaka, *et al.,* 2001) در هامور کوهان دار (*Chromileptes altivelis*)، به دنبال ۳ تزریق متوالی از یک واکسن نوترکیب، هربار به میزان۷۰µg، ایمنی نسبی مشاهده گردید. این واکسن حاصل از ۳ پروتئین کپسیدی بوده و به مدت ۱۰ روزتزریق گردید (Yuasa, *et al.,* 2002). Sommerset و همکاران (۲۰۰۱) به دنبال تزریق درون صفاقی در ماهیان جوان *Scophthalmus maximus* نشان دادند که واکسن نوترکیب پروتئین کپسید SJNNV مؤثر می‌باشد.

مطالعات بعدی آن‌ها احتمال ایجاد ایمنی در ماهی Turbot (*Scophthalmus maximus*) به دنبال استفاده از واکسن نوترکیب پروتئین کپسید AHNNV

Archive of SID
www.SID.ir

بود، در حالی که در گونه‌های مشابه که واکسن پروتئین کپسید DNA-AHNV به آن‌ها تزریق شده بود، هیچ گونه ایمنی مشاهده نگردید. یک نتیجه قابل توجه، در سطح ایمنی است که در *Scophthalmus maximus* به دست آمد که توسط واکسن DNA واکسینه شده بودند. این واکسن از ورود ژن کد کننده گلیکو پروتئین ویروس هموراژیک سپتی سمی (VHS) به نوداویروس جداسازی شده از *Hippoglossus hippoglossus* (AHNNV) به دست آمد (Sommerset *et al.*, 2003).

یک واکسن مؤثر از غیرفعال‌سازی سویه ژنوتیپی RGNNV به وسیله فرمالین به دست آمده است که با تلقیح درون صفاقی آن به گونه *Epinephelus septemphasciatus* نرخ بازماندگی (RPS) بالا و حدود ۸۵٪ به دست آمد (Yamashita, *et al.*, 2005). این اواخر نتایج تحقیقات Thiery و همکاران (۲۰۰۶)، حاصل از تزریق درون عضلانی واکسن نوترکیب حاصل از بیان کپسید در باکولوویروس، نشان داد که در شرایط آزمایشگاه می‌توان در Seabass های ۲۲ تا ۲۶ گرمی (*Dicentrarchus labrax*) ایمنی مؤثری ایجاد نمود.

وضعیت بیماری VNN/VER در ایران

- اولین بار بروز علایمی چون اتساع محوطه بطنی و شنای غیر طبیعی در کفال ماهیان صید شده در فاصله زمانی اسفند ۷۷ تا تیر ۱۳۷۷ در پره‌های صیادی استان‌های گیلان توسط صیادان و کارشناسان موسسه تحقیقات شیلات مشاهده و گزارش گردید.
- سلطانی و رهاننده (۱۳۸۰)، بر اساس علایم بالینی، عوارض مشاهده شده را تحت عنوان عارضه نفخ در کفال ماهیان گزارش کردند. در این تحقیق بررسی‌های بالینی،کالبدگشایی و میکروبیولوژی به عمل آمده بر روی تعداد ۵۰ قطعه ماهی کفال گونه پوزه باریک صید استان گیلان نشان داد که تعداد ۴۰ قطعه (۸۰ درصد) ماهیان مذکور مبتلا به عارضه نفخ ناشی از سوء تغذیه بوده‌اند.
- در گزارش دیگری از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مواردی از مشاهده تلفاتی در حدود ۴۰ قطعه از کفال ماهیان در حوضچه اسکله یگان ویژه نیروهای انتظامی خزر شهر به موسسه تحقیقات شیلات ایران اعلام گردید. در بررسی ۳۱ مورد از تلفات ماهیان کفال اراتوس با وزن کمتر از ۷۰ گرم در تاریخ ۱۳۸۰/۱۱/۲۴ در منطقه مزبور، به جز رگه‌های خونریزی در قسمت قدام تنه نزدیک به برانش، هیچگونه علایم غیر طبیعی دیگری اعم از زخم، پارگی محوطه بطنی یا جمع شدن مایعات در شکم ماهیان مشاهده نگردید (گزارش ارسالی از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۲ اسفند ۱۳۸۰).
- در اواخر پاییز ۱۳۸۱ در کفال ماهیان منطقه مرکزی استان مازندران (بابلسر و فریدون کنار)، بار دیگر این علایم فوق، در تعداد اندکی از ماهیان صید شده مشاهده گردید (گزارش ارسالی از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به معاونت صید و صیادی شیلات ایران ۱۳۸۱).
- در پی وقوع مجدد تلفات در سال ۱۳۸۲ در منطقه زیباکنار استان گیلان، گزارش محرمانه‌ای از بخش مدیریت ذخایر پژوهشکده آبزی پروری آب‌های

Archive of SID

www.SID.ir

داخلی (بندر انزلی) مبنی بر مشاهده نمونه‌هایی از کفال ماهیان با تورم شکمی در سه شرکت تعاونی پره منطقه جفرود تا زیبا کنار به بخش بهداشت و بیماری‌های موسسه تحقیقات شیلات ایران واصل گردید. بر اساس این گزارش بررسی‌های انجام شده بر روی صید سه شرکت تعاونی پره در منطقه یاد شده در تاریخ ۸۲/۱۰/۲۸ عمده صید این شرکت‌ها را ماهی کفال تشکیل داده که به ترتیب در حدود ۱۵، ۳۰ و ۱۳۰ کیلوگرم بود و بیش از ۹۵٪ آن‌ها دچار تورم شکمی بودند. متعاقب این گزارش تیم تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران به منطقه اعزام شده و مطالعات و نمونه-برداری‌های اولیه انجام شد که گزارش تخصصی آن برای اولین بار در کشور شامل اقدامات انجام شده، نمونه‌برداری‌های صورت گرفته، علایم بالینی و کالبدگشایی ماهیان مبتلا و انجام آزمایشات مربوطه تهیه و تدوین و ارایه گردید (ذریه زهرا و همکاران، ۱۳۸۳).

- بررسی‌های اولیه در مورد علل احتمالی وقوع این بیماری در قالب یک طرح آزمایشی (Case Study) توسط ذریه زهرا و همکاران در سال ۱۳۸۳ صورت گرفت و پس از انجام نمونه-برداری‌های متعدد از ماهیان مبتلا و آزمایش‌های تشخیصی اولیه همچون آسیب‌شناسی و باکتری شناسی و نیز رایزنی با اساتید متخصص خارجی، نمونه‌های مغز و چشم ماهیان واجد علایم بالینی به آزمایشگاه رفرانس سازمان OIE در کشور ژاپن جهت (Prof.T.Nakai) و نیز دانشگاه ملی تایوان جهت (Prof.C.S.Chi) ارسال گردید.
- در هر دو آزمایشگاه، آزمایش‌های تشخیص مولکولی RT – PCR و Nested PCR بر روی نمونه‌های ارسالی با هدف شناسایی Piscine nodavirus که عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی می‌باشد صورت گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات مزبور نشان از وجود بتانودا ویروس در نمونه‌های مغز ماهیان مبتلا داشت (مکاتبات شخصی ذریه زهرا با Prof.Nakai و Prof.Chi)
- محصول حاصل از Nested PCR تحت آنالیز سکانس قرار گرفت که نتیجه آن وجود رابطه‌ای نزدیک میان ویروس احتمالی و سایر نوداویروس-های گزارش شده عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی بود. همچنین آنالیز سکانس آمپلیکون RT–PCR، مشابهت ژنتیکی میان ویروس احتمالی و سویه RGNNV را تا حدود ۹۰٪ نشان داد (مکاتبات شخصی با محققین یاد شده).
- از نمونه‌های مغز ارسال شده به مرکز رفرانس (OIE) در ژاپن، هموژن فیلتر شده از مغز و چشم کفال ماهیان مبتلا تهیه و در ماهی گروپر هفت خط (Sevenband grouper) که ماهی بسیار حساس به سویه‌های این ویروس است مواجهه سازی به روش تزریق در اتاقک خلفی چشم صورت گرفت. در مواجهه این ماهیان با هموژن مزبورتلفات شدید (در حدود ۱۰۰٪) مشاهده گردید که بر اساس پروتکل‌های آزمایش پاتوژنیسته و اثبات بیماریزایی، سه بار این عمل تکرار شد. در آزمایشات مولکولی به روش Nested PCR که بر روی نمونه‌های مغز ماهیان تلف شده انجام شد، وجود ویروس عامل بیماری

Archive of SID
www.SID.ir

نکروز عصبی ویروسی مثبت اعلام گردید (مکاتبات شخصی ذریه زهرا با محققین یاد شده).

- عامل نوداویروس از نمونه‌های فوق الذکر با روش تشخیصیNested RT-PCR ردیابی و برای نخستین بار در کشور به عنوان اولین مورد گزارش بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در کفال ماهیان دریای خزرگزارش گردید (ذریه زهرا و همکاران ۲۰۰۵).
- در این بررسی هیچ گونه عامل باکتریایی بیماریزا مشاهده نشد و فاکتورهای محیطی و اکولوژیکی مکان وقوع تلفات طبیعی بود.
- ذریه زهرا و همکاران در یک بررسی در اسفند ۱۳۸۳ بر مبنای گشت دریایی انجام شده توسط بخش ارزیابی ذخایر انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری در زمستان ۸۳ که ۳۲ ایستگاه دریایی را در استان گیلان تحت پوشش داشته است ۷۳ عدد ماهی خاویاری به صورت تصادفی صید شد که در مجموع ۳۵ نمونه از مغز و چشم این ماهیان بر اساس پروتکل مربوطه مورد فراوری قرار گرفته و سوپرناتانت حاصله به آزمایشگاه‌های رفرانس ذکر شده ارسال گردیدندکه در آزمایشات مولکولی با روش Nested RT-PCR انجام شده،۲۰٪ از نمونه‌های فوق از نظر وجود بتانودا ویروس احتمالی مثبت اعلام گردیدند [مکاتبات شخصی ذریه زهرا با (Prof.Nakai و Prof.Chi) و مستندات موجود] مورد فوق در صورت انتشار می‌توانست به عنوان اولین مورد وقوع بیماری در ماهیان خاویاری در جهان مطرح گردد که به توصیه مسئولین وقت موسسه و به دلیل احتمال بروز مشکلاتی بر سر راه صادرات خاویار ایران در آن ایام، متاسفانه این موضوع تحقق نیافت) این در حالی است که Athanossopoulou و همکاران درکشور یونان و در همان سال وقوع بیماری و حساسیت ماهیان خاویاری *Acipenser gueldenstaedti* (Russian sturgeon) را به صورت تجربی برای نخستین بار در جهان گزارش نمودند.
- طی بررسی انجام شده توسط پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر از زمستان ۱۳۸۳ تا تابستان ۱۳۸۴ که نمونه‌برداری با روش ترال و توسط شناور تحقیقاتی گیلان از ۴۹ ایستگاه نمونه‌برداری در سراسر سواحل جنوبی دریای خزر صورت گرفت، مشخص گردید که بروز علایم بالینی خاص این بیماری نوظهور در تابستان بیشتر از زمستان بوده است. همزمان با استان مازندران در استان گیلان نیز طی گشت دریایی که در تیرماه ۱۳۸۴ صورت گرفت در ۹۳٪ ماهیان کفال صید شده علایم بالینی مشابه مشاهده گردید (گزارش پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، شهریور ۱۳۸۴).

Archive of SID

www.SID.ir

الف ب

شکل ۹: نمایی از وضعیت ظاهری (الف) و داخلی(ب) ماهیان بیمار صید شده طی زمستان ۱۳۸۳ تا تابستان ۱۳۸۴
(تصاویر از: محدث قاسمی)

- شریف پور و ذریه زهرا در سال ۱۳۸۴ در بررسی آسیب‌شناسی بافت‌های مختلف کفال ماهیان مبتلا، حضور نکروز و واکوئول را درلایه گرانولار مغز و مخچه گزارش کردند (چهارمین کنفرانس دامپزشکان علوم بالینی، ارومیه، ۱۳۸۴).
- زاهدی و همکاران (۲۰۰۸) از برخی کفال ماهیان بیمار، باکتری ویبریو جداسازی و گزارش کردند.
- متعاقب دریافت گزارشات مکرری از استمرار تلفات و مشاهده وجود علایم بالینیی در ماهیان کفال صید شده در استان‌های شمالی کشور در سال ۱۳۸۵ طرح جامع تحقیقاتی در موسسه تحقیقات شیلات ایران به تصویب رسید که این مطالعه توسط ذریه زهرا و همکاران (۱۳۸۵) به منظور جداسازی و شناسایی نوداویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) از ماهیان کفال طلایی دریای خزر صید شده در صیدگاه-های استان‌های حاشیه دریای خزر شامل گیلان، مازندران و گلستان با کمک روش‌های کشت سلولی، Nested-RT-PCR ، IFAT ، IHC ، هیستوپاتولوژی، هماتولوژی، باکتریولوژی و میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت.
- در صیدگاه‌های سه استان مذکور ضمن مراجعات مکرر به پره‌های صیادی در طول فصول صید طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ تعداد ۳۶۸ ماهی کفال طلایی دارای شنای نامتعادل، تیرگی رنگ و اتساع محوطه شکمی در محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم مشاهده گردید که در کالبد گشایی هیچ گونه علامتی به جز بادکردگی واضح کیسه شنا نداشتند.
- جهت شناسایی عامل اصلی تلفات ابتدا بافت‌های مغز و چشم در شرایط استریل جداسازی شده و جهت انجام آزمایشات کشت سلولی و Nested-RT-PCR در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شد. به طور همزمان قطعاتی از بافت‌های مذکور در فرمالین ۱۰ درصد جهت انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی و قطعه‌ای در گلوتارآلدهید ۳ درصد برای آزمایش میکروسکوپ الکترونی تثبیت گردیدند. آثار آسیب سلولی (CPE) شش روز بعد از تلقیح هموژن فیلتر شده بافت‌های مغز و چشم بر روی

Archive of SID
www.SID.ir

تک لایه سلولی SSN-1 به صورت واکوئولاسیون مشاهده شد که در پاساژهای دوم و سوم نیز با شدت بیشتری ایجاد گردید. در مجموع تلقیح هموژن ۹ نمونه از ۳۶۸ ماهی باعث ایجاد CPE گردید.

- انجام آزمایش Nested RT-PCR بر روی نمونه‌های بافتی و سلول‌های SSN-1 آلوده شده (CPE مثبت) نتایج مشابهی را به همراه داشت. در آزمایش مستقیم بافت آلوده تعداد ۲۱ نمونه مثبت بوده و همچنین تمام نمونه‌های حاصل از سلول‌های SSN-1 آلوده در آزمایش مثبت تشخیص داده شدند.
- در ادامه تشخیص نوع ویروس، آزمایش ایمونوفلورسنت با استفاده از ۲ نوع آنتی بادی مونوکلونال مختلف بر روی مقاطع بافتی مغز و چشم ماهیان کفال دارای علایم و سلول‌های آلوده شده SSN-1 انجام شد که ایجاد نقاط درخشان حاکی از وجود آنتی ژن نودا ویروس در نمونه‌های مورد آزمایش بود و نتایج کشت سلول و Nested RT- PCR را تایید نمود.
- در بررسی آثار بافتی بر روی نمونه‌های فرمالینه، واکوئولاسیون در مقاطع مغز و شبکیه چشم، نخاع و عصب بینایی در اکثر نمونه‌ها مشاهده گردید. در ادامه با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد نودا ویروس و رنگ آمیزی DAB بر روی مقاطع بافتی در آزمایش ایمونوهیستوشیمی حضور آنتی ژن‌های نودا ویروس به صورت نقاط قرمز- قهوه‌ای مشخص گردید.
- در آزمایش میکروسکوپ الکترونی با توجه به پراکندگی ویروس در نمونه‌های بافتی، مقاطع ویروس به صورت دوایری با قطر حدود ۳۰ nm و دارای آرایش منظم تنها در یک مقطع چشم ماهی کفال مشاهده گردید.
- برای پی بردن به بیماری‌زایی ویروس جداشده و امکان انتقال آن به گونه‌های دیگر سوپرناتانت سلول SSN-1 دارای CPE با ماهیان گوپی (به صورت حمام) (Nazari, *et al.*, 2011) و بچه ماهیان قره برون (به صورت تزریق در پشت حدقه چشم) مواجهه سازی صورت گرفت که در هر دو مورد علاوه بر بروز علایم بالینی واکوئولاسیون شدید در بافت مغز و شبکیه چشم مشاهده شد.
- در ادامه مطالعات بیماریزایی، بررسی‌های تکمیلی بر روی نمونه‌های گوپی دارای علایم بالینی از نظر آزمایش میکروسکوپ الکترونی و ایمونوهیستو- شیمی صورت گرفت و نتایج حاصله نشان داد که حضور نودا ویروس با بروز علایم بالینی و کالبد گشایی و تلفات در ارتباط بوده و می‌توان بتا نودا ویروس را به عنوان عامل اصلی تلفات کفال ماهیان طلایی دریای خزر محسوب نمود (Nazari, *et al* ., 2011).
- به موازات این تحقیق در مطالعات بعدی عامل ویروسی از کفال ماهیان دارای علایم بالینی شدید و در حال مرگ بر روی تیره‌های سلولی حساس در پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی (انزلی) جداسازی و شناسایی گردید(Soltani, *et al.*, 2010 ؛ قاسمی، ۱۳۸۹).

نتیجه گیری

همانگونه که واضح است عملاً راه درمان چندان موثری برای بیماری‌های ویروسی و به خصوص در

Archive of SID

www.SID.ir

ماهیان دریایی به دلیل گستردگی میدانی آن‌ها وجود ندارد (Thiery, *et al.*, 2006). بنابراین بهترین راه پیشگیری از انتقال بیماری به مزارع پرورشی است. در این مورد باید نکات ایمنی مذکور رعایت گردد و همچنان مطالعات بیشتر چه در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده و چه به صورت طبیعی انجام گیرد. اگر پرورش ماهیان دریایی بر اساس شرایط موجود ادامه یابد، آلودگی به نوداویروس‌ها همانند سایر بیماری‌های عفونی چه از نظر جغرافیایی و چه از نظر گونه‌های میزبان افزایش چشمگیری خواهد یافت. در ضمن بررسی‌های ویروسی و مولکولی دقیقی برای شناسایی این بیماری نیاز خواهد بود. به ویژه مقایسه توان آلوده‌سازی میان ویروس‌های جداشده از منابع مختلف، یک نیاز ضروری است که با موفقیت‌های اخیر در کشت نوداویروس باس دریایی Seabass این موضوع تا اندازه‌ای آسان‌تر گردیده است (Munday and Nakai, 1997). از طرفی با وجود گذشت حدود ۲۰ سال از اولین گزارش رخداد این بیماری، برخی مسایل هنوز حل نشده باقی مانده‌اند موضوعاتی همچون مکانیسم انتقال بیماری و نقش حامل‌های فاقد علایم بالینی در انتقال بیماری هنوز کاملاً مشخص نیست. در برخی از گونه‌ها احتمال انتقال عمودی قویاً مطرح است؛ با این وجود هنوز به طور قطعی مشخص نشده است که در واقع یک انتقال عمودی قطعی و کامل صورت می‌گیرد یا این که آلودگی به صورت سطحی بر روی تخم رخ می‌دهد. اگر چنین باشد، این نکته مهم است که روش ضدعفونی مؤثری یافت شود تا از انتقال و گسترش بیماری از مولدین آلوده به بچه ماهیان جلوگیری کند. به عبارت دیگر در صورت بروز یک انتقال درون تخمدانی واقعی، تنها راه برای جلوگیری از آلودگی در مرحله لاروی یا بچه ماهیان، شناسایی و جداسازی مولدین آلوده Subclinical می‌باشد، به موازات آن ضدعفونی آب ورودی به سالن تکثیر نیز الزامی است.

بدین منظور همان طور که توسط برخی محققان پیشنهاد شده است، غربال گری مولدین (Screening Test) می‌تواند به کمک روش‌های تشخیص مولکولی برای بررسی حضور ویروس در تخمدان و مایعات تناسلی، و یا بیوپسی گنادهای مولدین انجام گیرد و همزمان با استفاده از روش‌های سرولوژیک از قبیل ELISA، می‌توان وجود آلودگی‌های قبلی در مولدین را ردیابی نمود.

در آینده نیز می‌بایست به اثرات متقابل و مبادلات (Interactions and exchanges) عوامل بیماریزا، در بین جمعیت‌های پرورشی و وحشی ماهیان بیشتر توجه داشت تا بتوان میزان خطر انتقال از یک محیط به محیط دیگر را تعیین کرد. علیرغم همه تلاش‌هایی که می‌توان اجرا نمود و سنجش‌های محدودتری که می‌توان به کار برد، پیش‌بینی‌ها بر آن است که بهترین نتیجه در کنترل این بیماری زمانی به دست خواهد آمد که یک واکسن مؤثر و کارا در اختیار باشد و برنامه‌های واکسیناسیون منظم و مستمر را در جهت ارتقای سیستم ایمنی بچه ماهیان حساس و مولدین مزارع اجرا نمود.

سپاسگزاری

وظیفه خود می‌دانیم از همه همکاران عزیزی که در موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده‌های تابعه در استان‌های گیلان و مازندران و گلستان در این ده سال اخیر افتخار همکاری صمیمانه با آن‌ها را داشتیم و بدون مساعی خالصانه آنان امکان دستیابی به نتایج و

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌های تحقیقاتی یاد شده میسر نبود صمیمانه تقدیر و تشکر نماییم.

عزیزان فرهیخته‌ای همچون دکترعیسی‌شریف پور، دکتر مصطفی‌شریف روحانی، دکترمریم قیاسی، دکتر علیرضا نظری، دکتر سمیه حقیقی‌کارسیدانی، دکتر علی اصغر سعیدی، دکتر محمدرضا مهرابی، دکتر شاپور کاکولکی، دکترکورس رادخواه، دکتر مهدی سلطانی، دکتر پروانه صیفوری، دکتر جمال نجفی، دکتر عباس نوری، دکتررضا پورغلام، دکتر حسینعلی خوشباور رستمی، دکتر علیرضا شناور ماسوله، دکتر مهدی معصوم زاده، مهندس سهیل بازاری مقدم، مهندس بندانی، مهندس بابک رمضانی، مهندس احسان روستایی، مهندس یاسر پاک نیت، مهندس الهه محمودی و مهندس سمانه موسوی که در این راه هماره یاریگر و همراه و در کنار تیم تحقیقاتی ما بودند و نیز اساتید معظم و مشاورین بین المللی همچون (Prof. G. Bovo) از کشور ایتالیا، (Prof. T. Nakai) از کشور ژاپن، (Prof. C. S. Chi) از کشور تایوان و (Prof. Hassan Hj Mohd Daud) از کشور مالزی و (Dr. Igor Shchelkonov) از کشور روسیه که در این ده سال بارها از محضر علمی آنان بهره‌ها بردیم و نیز همکاران دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران آقایان دکتر ابراهیم زاده موسوی، مهندس هادی باقری و مهندس صیدانلو صمیمانه تقدیر و تشکر نماییم و توفیقات روزافزون همه این عزیزان را از درگاه خداوند متعال مسئلت داریم.

منابع

۱. ذریه زهرا، م. ج.، ۱۳۸۳. گزارش تخصصی وقوع اولین مورد بیماری نکروز عصبی ویروسی در ماهیان کفال طلایی دریای مازندران. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۴۵ صفحه.

۲. ذریه زهرا، م. ج. و همکاران.، ۱۳۹۰. گزارش نهایی پروژه مطالعه بیماری نکروز عصبی ویروسی (جداسازی ، شناسائی و بیماریزائی آن) درکفال ماهیان دریای خزر و بررسی بیماریزائی و احتمال انتقال آن به سایر ماهیان (ماهیان خاویاری– ماهی سفید و ماهیان پرورشی) در کشور، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۵۵ صفحه.

۳. قاسمی، م.، ۱۳۸۹. جداسازی و شناسایی عامل ویروسی تلفات کفال ماهیان(Mugilidaeh) دریای خزر، رساله دکترای تخصصی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، ۷۴ صفحه.

4. Arimoto, M., Maruyama, K., Furusawa I., 1994. Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. Fish Pathology. Vol. 29, pp. 19-24.
5. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., Furusawa I., 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Aquaculture. Vol.143, pp. 15-22.
6. Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K., Furusawa, I., 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fish Pathology. Vol. 27, pp. 191-195.
7. Azad, I. S., Jithendran, K. P., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasua, A. R., de la Pena, L. D., 2006. Immunolocalization of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian seabass (*Lates calcarifer)* (Bloch) a case study. Aquaculture. Vol. 255, pp. 39-47.
8. Azad, I. S., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., Poornima, M., Kailasam, M., Rajan, J. J. S., Ali, S. A., Abraham, M., Ravichandran, P., 2005. Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. Dis. Aquat. Org. Vol. 63, pp.113-118.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Binaii, M., Ghiasi, M., Zorriehzahra, M. J. Bahonar, A. R., 2008. Evolution of hematological and some biochemical and immunological factors of golden grey mullet (*Liza auratus*) from southern Caspian Sea (Golestan province) Proceedings of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Florence, Italy.108 P.
10. Binaei, M., Ghiasi, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, M. J., Saidi, A. A., Behrozi, S. H., 2010. Comparison study on Hemathological Factors between health and suspected Golden grey mullet *Liza auratus* in Mazandaran Province. 16th Proceedings of Iranian Veterinary Congress, April 27-29, 2010 Tehran Iran.418 P.
11. Bloch, B., Gravningen, K., Larsen, J. L., 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. Disease Aquat. Org. Vol. 10, pp. 65-70.
12. Bovo, G., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F., Comuzzi, M., 1996. Viral Encephalo-retinopathy of reared sea bass: first detection in Italy. Boll. Soc. It. Patol. Ittica. Vol. 19, pp. 52-64.
13. Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F., Pichot, Y., 1991. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared seabass (Dicentrarchus labrax) larvae and juveniles. Aquaculture. Vol. 97, pp. 109-116.
14. Breuil, G., Pepin, J. F., Boscher, S., Thiéry, R., 2002. Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J. Fish Disease. Vol. 25, pp. 697-702.
15. Chi, S. C., Shieh, J. R., Lin, S. J., 2003. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. Disease Aquat. Org. Vol. 55, pp. 221-228.
16. Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E., Chen, S. N., 1997. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara*. Fish Disease. Vol. 20, pp. 185-193.
17. Dalla Valle, L., Negrisolo, E., Patarnello, P., Zanella, L., Maltese, C., Bovo, G., Colombo, L., 2001. Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. Arch Virol. Vol. 146, pp. 1125-1137.
18. Dalla Valle, L., Toffolo, V., Lamprecht, M., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., 2005. Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. Vet Microbiol. Vol. 110, pp. 167-179.
19. Danayadol, Y., Direkbusarakom, S., Supamattaya, K., 1995. Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. In: Shariff M., Arthus J.R., Subasunghe R.P. (eds). Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health sec, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 227-233.
20. Delsert, C., Morin, N., Comps, M., 1997a. Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell culture. Virology. Vol. 71, no.7, pp. 5673-5677.
21. Delsert, C., Morin, N., Comps, M., 1997b. A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. Arch Virology. Vol. 142, pp. 2359-2371.
22. Fenner, B. J., Goh, W., Kwang, J., 2006. Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein. Journal of Virology. Vol. 80, pp. 6822- 6822.
23. Fryer, J. L., Lannan, C. N., 1994. Three decades of cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. J. Tiss. Cult. Methods. Vol. 10, pp. 57-94.
24. Galeotti, M., Beraldo, P., Patarnello, P., Sarli, G., Volpatti, D., 1999. Encefalopatia-retinopatia viral (VER-VNN) in giovanili di branzino (*D. labrax*) in assenza di lesioni tipiche di vacuolizzazion cellulare. Boll. Soc. It. Patol. Ittica. Vol. 27, pp. 45-56.
25. Glazebrook, J. S., Heasman, M. P., De Beer, S. W., 1990. Picorna-like viral

Archive of SID

www.SID.ir

particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Journal of Fish Disease. Vol. 13, pp. 245-249.
26. Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., Youn, H. Y., Hwang, C. Y., Park, J. H., Park, S. C., 2006. Detection of betanodaviruses inapparently healthy aquarium fishes an invertebrates. Vet. Sci. Vol. 4, pp. 369-374.
27. Grotmol, S., Totland, G. K., Kvellestad, A., Fjell, K., Olsen, A. B., 1995. Mass mortality of larval an juvenile hatchery-reared halibut (Hippoglossus hippoglossus L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. Bull. Eur. Ass. Fish Pathology. Vol. 15, No. 5, pp. 176-180.
28. Grove, S., Johansen, R., Dannevig, B. H., Reitan, L. J., Ranheim, T., 2003. Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. Dis Aquat. Org. Vol. 53, pp. 211-221.
29. Grove, S., Faller, R., Soleim, K. B., Dannevig, B. H., 2005. Absolute quantitation of RNA by competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. Virol Methods. Vol. 132, pp. 104-112.
30. Hegde, A., Chen, C. L., Qin, Q. W., Lam, T. G., Sin, Y. M., 2002. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina* , in Singapore. Aquaculture. Vol. 213, pp. 55–72.
31. Hegde, A., The, H. C., Lam, T. J., Sin, Y. M., 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. ArchVirol. Vol. 148, pp. 575-586.
32. Hick, P., Tweedie, A., Whittington, R., 2010. Preparation of fish tissues for optimal detection of betanodavirus. Aquaculture. Vol. 310, pp. 20–26.
33. Husgaret, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B. K., Rodseth, O. M., Biering, E., 2001. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut Hippoglossus hippolgossus, and evaluation of a vaccine against SJNNV. Disease Aquat. Org. Vol. 45, pp. 33-44.
34. Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., Okuno, T., 2001. Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. Gen. Virol. Vol. 82, pp. 2653-2662.
35. Johansen, R., Ranheim, T., Hansen, M. K., Taksdal, T., Totland, G. K., 2002. Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. Disease Aquat. Org. Vol. 50, pp. 161-169.
36. Johansen, R., Grove, S., Svendsen, A. K., Modahl, I., Dannevig, B., 2004a. A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. Fish Disease. Vol. 27, pp. 327-341.
37. Johansen, R., Sommerset, I., Torud, B., Korsnes, K., Hjortaas, M. J., Nilsen, F., Nerland, A. H., Dannevig, B. H., 2004b. Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, Scophthalmus maximus (L.). Journal of fish disease. Vol. 27, pp. 591-601.
38. Haghighi Karsidani, S., Zorriehzahra, M. J., Pourkazemi, M., Shenavar Masouleh, A., Bazari Moghaddam, S., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M., Alizadeh, M. L., Chakmedouz, F., Ghasemi, M., 2009. Molecular investigation of viral nervous necrosis in *Acipenser persicus* from Caspian Sea, Proceedings of First International Congress on Health Management and Diseases of Aquatic, Tehran, Iran.175 P.
39. Hassan, H. M., Tengku, T. A. I., Nazari, A., Zorriehzahra, M. J., 2008.

Archive of SID

www.SID.ir

Histopathological Studies of Viral Nervous Necrosis (VNN) in the Wild Golden Grey Mullet of the Caspian Sea, Procceding of 6th ASEAN Microscopy Conference. A Nanoscience Science Approach in Commercialization, Malaysia.285 P.

40. Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2008. A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). Aquaculture. Vol. 284, pp. 41–45.
41. Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J., Ollevier, F., 1997. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Fish Disease. Vol. 20, pp. 145-151.
42. Maltese, C., Bovo, G., 2007. Monografie viral encephalopathy and retinopathy. Ittiopatologia. Vol. 4, pp. 93-146.
43. Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T., Kanno, T., 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. Fish Pathol. Vol. 26, pp. 209-210.
44. Munday, B. L., Langdon, J. S., Hyatt, A., Humphrey, J. D., 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquaculture. Vol. 103, pp. 197-211.
45. Munday, B. L., Nakai, T., 1997. Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. World J. Microb. Biotech. Vol. 13, pp. 375-381.
46. Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K., 1994. Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). Fish Pathology. Vol. 29, pp. 177-182.
47. Nakai, T., Nguyen, H. D., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M., Ootsuki, K., 1994. Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. Fish Pathology. Vol. 29, pp. 211-212.
48. Nazari, A., Hassan, M. D., Zorriehzahra, M. J., Azmi,T. I., Siti, S. A., 2011. Isolation and Identification of Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease in wild Golden Grey mullet, *(Liza auratus)* captured in Iranian water of Caspian sea. Ph.D thesis, University of Putra Malaysia (UPM), 280 P.
49. Nishizawa, T., Mori, K., Furushashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K., 1995. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. General. Virology. Vol. 76, pp. 1563-1569.
50. Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K., 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Disease Aquat. Org. Vol. 18, pp. 103-107.
51. Nishizawa, T., Takano, R., Moruga, K., 1999. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus. Journal of general virology. Vol. 80, pp. 3023- 3027.
52. Nguyen, H. D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T., Muroga, K., 1994. Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder Paralichthys olivaceus. Fisheries Science. Vol. 60, pp. 551-554.
53. Nguyen, H. D., Nakai, T., Muroga, K., 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack Pseudocaranx dentex larvae. Disease Aquat. Org. Vol. 24, pp. 99-105.
54. Nguyen, H. D., Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K., 1997. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. Disease Aquat. Org. Vol. 28, pp. 87-91.
55. Oh, M. J., Jung, S. J., Kim, S. R., Rajendran, K. V., Kim, Y. J., Choi, T. J., Kim, H. R., Kim, J. D., 2002. A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture. Vol. 211, pp. 1–7.
56. Office International Epizooties., 2006. Viral Encephalopathy and Retinopathy. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal, Office International des Epizooties (OIE), Paris, France, pp. 169-175.

Archive of SID

www.SID.ir

57. Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Redman, R., Lightner, D. V., 2007. Identification of a nodavirus that causes muscle necrosis in *Litopenaeus vannamei* and the development of an in situ hybridization and RT-PCR assay for its detection. Meeting abstract World Aquaculture Society.345 P.
58. Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., Baudin Laurencin, F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. Disease Aquat. Org. Vol. 36, pp. 11-20.
59. Saeedi, A. A., Zorriehzahra, M. J., Ghiyasi, M., Binaii, M., Hadiyan, Mand Mahdavi, A., 2008. Comparison of some of the most important hematological parameters in *Liza auratus*, Proceeding of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Florence, Italy. 108 P.
60. Schneemann, A., Ball, L. A., Delsert, C., Johnson, J. E., Nishizawa, T., 2005. Family Nodaviridae. In virus taxonomy. Eight report of the international committee on the taxonomy of viruses. C.M., Fauquet , M.A., Mayo, J. Maniloff., U. Desselberger and L.A. Ball. (eds.), Elsevier, Academic Press. New York, pp. 865-872.
61. Schneemann, A., Marshall, D., 1998. Specific encapsidation of nodavirus RNAs is mediated through the C terminus capsid precursor protein alpha. Journal of Virology. Vol. 72, pp. 8738-8746.
62. Skliris, G. P., Richards, R. H., 1998. Assessment of the susceptibility of the brine shrimp Artemia salina and rotifer Brachionus plicatilis to experimental nodavirus infections. Aquaculture. Vol. 169, pp. 133-141.
63. Soltani, M., Ghasemi, M., Sharif Rohani, M., Sharifpour, I., Zorriehzahra, M. J., 2010. Isolation and identification of Betanodavirus causing mass mortalities in golden grey mullet *(Liza auratus)* in the Caspian Sea, Int.J.Vet.Res. 4, 201-208.
64. Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., Jenkins, M. E., Roy, W. J., Richards, R. H., Ferguson, H. W., 2001. Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. Vet. Record. Vol. 149, pp. 179-181.
65. Tanaka, S., Aoki, H., Nakai, T., 1998. Pathogenicity of the Nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Fish Pathology. Vol. 33, pp. 31-36.
66. Thiery, R., Peducasse, S., Castric, J., Le Ven, A., Jeffroy, J., Baudin Laurencin, F., 1997. Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy to juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathology. Vol. 17, pp. 118-122.
67. Thiery, R., Arnauld, C., Delsert, C., 1999. Two isolates of seabass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. Fish Disease. Vol. 22, pp. 201-207.
68. Thiery, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., Schneemann, A., 2006. Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the european sea bass *Dicentrarchus labrax* by using Betanodavirus Virus-like particles. Journal of Virology. Vol. 80, No. 20, pp. 201-207.
69. Totland, G. K., Grotmol, S., Morita, Y., Nishioka, T., Nakai, T., 1999. Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack Pseudocaranx dentex and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* studied by waterborne challenge of yolksac larvae of both teleost species. Disease Aquat. Org. Vol. 38, pp. 169-175.
70. Yoshikoshi, K., Inoue, K., 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, Oplegnathus fasciatus (Temminck and Schlegel). Fish Disease. Vol. 13, pp. 69-77.
71. Yoshimizu, M., Suzuki, K., Nishizawa, T., Winton, J. R., Ezura, Y., 1997. Antibody screening for the identification of nervous necrosis carriers in flounder broodstock. In: Proceeding NRIA International Workshop on New approaches to Viral

Archive of SID

www.SID.ir

Diseases of Aquatic Animals, Kyoto, pp. 124-130.
72. Zorriehzahra, M. J., Nakai, T., Sharifpour, I., Gomes, D. K., Chi, S. C., Soltani, M., Mohd, D., Hj, H., Sharif Rohani, M., Saidi, A. A., 2005. Mortality wild golden mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea associated with viral nervous necrosis like agent. Iranian Journal of Fisheries Science. Vol. 45, pp. 43-58.
73. Zorriehzahra, M. J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Soltani, M., Haghighi Karsidani, S., Sharifpour, I., Bovo, G., Nakai, T., Saidi, A. A., Nazari, A., Sharif Rohani, M., Mosavi, S., 2009. Viral Nervous Necrosis (VNN) as Epizootic and New Invasion Disease in Caspian Sea, Proceeding of Fifth Iranian Virology Conference, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak-Karaj, Iran.285 P.
74. Zorriehzahra, M. J., Ghasemi, M., Soltani, M., Ghiasi, M., Haghighi karsiadani, S., Nazari, A., Sharifpour, I., Bovo, G., Nakai, T., Nouri, M., Saidi, A. A., Sharif Rohani, M., Mosavi, S., 2010. Viral Nervous Necrosis (VNN) Epizootic and New Invasion Disease in Caspian Sea, Proceeding of 16th Iranian Veterinary Congress, April 27-29, 2010 Tehran Iran. 418 P.
75. Zorriehzahra, M. J., Gasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, H. S., Nakai, T., Sharifpour, I., Chi, C. S., Soltani, M., Saeifouri, P., Najafi, J., Saidi, A. A., 2010. Study on Viral Nervous Necrosis (VNN) as a New Invasion and Epizootic Disease in Caspian Sea. Proceeding of 2010 International Aquatic Veterinary Conference, 12-19th July 2010, Athens, Greece. 52 P.
76. Zorriehzahra1, M. J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, H., Nazari, A., Soltani, M., Sharifpour, I., Bovo, G., Hassan, H. M. D., Seifouri, P., Najafi, J., Nouri, A., Roustaei, E., Paknieat, Y., Mahmoudi, E., 2010. Viral Nervous Necrosis (VNN) as a new emerging disease in the Caspian Sea. Proceeding of 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Managementand Diseases. (Keynote Speaker) 26-27 Oct. 2010, Tehran, Iran.181 P.
77. Nazari, A., Hassan, M. D. Zorriehzahra, M. J., Azmi, T. I., Siti, S. A., Sharifpour, I., Sharif Rohani, M., Ramezani, B., Seyfuri, P., Najafi, J., Nuri, M., 2010. Susceptibility Assessment of Guppy Fish (*Poecilia reticulate)* to Viral Nervous Necrosis Disease. Proceeding of 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Managementand Diseases. 26-27 Oct. 2010, Tehran, Iran. 181 P.
78.
79. Zahedi, M., Ghiasi, M., Zorriehzahra, M. J., Saidi, A. A., 2008. Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF), Conference, Florence, Italy/ Proceeding Book, pp. 225-226.
80. Zorriehzahra1, M. J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, S., Nazari, A., Soltani, M., Sharifpour, I., Bovo, G., Hassan, M. D., Seifouri, P., Najafi, J., Nouri, A., Roustaei, E., Paknieat, Y., Mahmoudi, E., 2011. Viral Nervous Necrosis (VNN) as a new fish viral emerging disease in the Iranian waters of Caspian Sea. Proceeding of International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance.4-7 Feb.2011, Vienna, Austria..275 P.
81. Zorriehzahra, M. J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Nazari, A., Haghighi Karsidani, S., Bovo, G., Hassan, M. D., Soltani, M., Sharifpour, I., Rohani, M. S., Seifouri, P., Najafi, J., Nouri, A., 2011. Investigation on Mortality of wild Golden grey mullet *(liza auratus)* associated with Viral Nervous Necrosis (VNN): An Emerging disease in Iranian water of the Caspian Sea. Proceeding of 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 12-16 Sept.2011, Split, Croatia.256 P.
82. Zorriehzahra, M. J., Nazari Sharifpour, I., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, S., Bovo, G., Hassan, M. D., Soltani, M., Rohani, M. S., Seifouri, P., Najafi, J., Nouri, A., 2011. Histopathology study on morbidity and mortality of wild golden grey mullet (*Liza aurata*) and

Archive of SID

www.SID.ir

leaping mullet (*Liza saliens*), associated with viral nervous necrosis (VNN) in Iranian waters of the Caspian Sea. 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. CD of Histopathology workshop, 17th Sept.2011, Split, Croatia.85 P.

Archive of SID

www.SID.ir