DOI:10.22092/vj.2020.128441.1652
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تأثیر بیماری ویروسی سپتی سمی هموراژیک (VHS) بر پارامترهای بیومتری در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss)

• **محمد قادرزاده(نویسنده مسئول)**
دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
• **قدرت رحیمی میانجی**
دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
• **اردشیر نجاتی جوارمی**
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **نسترن شهبازیان**
سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۸-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۰-۱۱
Email: mg.mahabad1365@gmail.com

چکیده

پژوهش حاضر به منظور ارزیابی تأثیر بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی بر صفات بیومتری ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام شد. تعداد ۲۸۱ قطعه ماهی با وزن اولیه ۳/۳۸ ± ۸۸ گرم بعد از ۱۸ روز دوره عادت دهی به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. همه گروه‌های آزمایشی با جیره غذایی تجاری تغذیه شدند. گروه اول به عنوان شاهد (بدون تزریق) در نظر گرفته شد، اما گروه‌های دوم تا پنجم به ترتیب با سرم فیزیولوژی سه صدم میلی‌لیتر، سرم فیزیولوژی شش صدم میلی‌لیتر، ویروس سپتی سمی سه صدم میلی‌لیتر و ویروس سپتی سمی شش صدم میلی‌لیتر با غلظت $4.5x10^{4}$ $pfu.ml^{-1}$، تزریق شدند. جهت تشخیص بیماری از تست RT-PCR استفاده شد. مدت دوره‌ی پژوهش ۳۵ روز و رکوردبرداری صفات وزن بدن و طول ماهیان (طول استاندارد، طول چنگالی و طول کل)، در روزهای ۲۸ و ۳۵ پرورش انجام شد. مقایسات میانگین این صفات در بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون توکی (HSD) و نرم‌افزار R انجام شد. در نتایج مربوط به وزن بدن در هفته اول بعد از چالش (روز ۲۸) بین گروه شاهد با گروه‌های تزریق شده با ویروس سپتی سمی در سطح (P<۰/۰۰۱) و همچنین بین گروه تزریق سرم فیزیولوژی و گروه تزریق ویروس سپتی سمی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). در هفته دوم بعد از چالش (روز ۳۵) بین گروه‌های تزریق سپتی سمی با دیگر گروه‌های آزمایشی (گروه شاهد، گروه‌های تزریق سرم فیزیولوژی) برای صفت وزن بدن تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). در هفته دوم بعد از چالش بین گروه‌های مختلف آزمایشی برای صفات مرتبط با طول ماهی (طول استاندارد، طول چنگالی و طول کلی) تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج مشاهده شده بروز بیماری VHS باعث کاهش رشد ماهیان شده و زیان اقتصادی در برخواهد داشت.

کلمات کلیدی: ماهی قزل آلای رنگین کمان، ویروس سپتی سمی هموراژیک، رشد

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 111-123

Effect of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) disease on the biometric parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

By: Ghaderzadeh M., (Corresponding Author) Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Rahimi Mianji G., Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Nejati Javaremi A., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Shahbazian N., Iran Veterinary Organization, Tehran. Iran.

Received: 2019-11-13 **Accepted: 2020-01-01**

Email: mg.mahabad1365@gmail.com

To evaluate the influence of VHS disease on rainbow trout biometric traits, this research was conducted. Two hundred eighty-one rainbow trout (88±3.38 g initial weight) were collected, and after 18 days of adaptation period were randomly divided into five groups. All experimental groups were fed by commercial ration. The first group was selected as a control group (no injection), but the second to fifth groups were injected with 0.03 ml physiological serum, 0.06 ml physiological serum , 0.03 ml VHSV, and 0.06 ml VHSV with the concentration of $4.5x10^4$ pfu.ml $^{-}$ respectively. To diagnose the disease, RT-PCR test was used. The research period was 35 days, and records of body weight, and fish length (standard length, fork length and, total length) were collected on days 28, and 35 of rearing. Mean comparisons of these traits between different groups were conducted using the Tukey test (HSD) and R software. In the results of body weight in the first week after challenge (day 28) significant differences were observed between the control group with VHSV injected groups ($p<0.001$) and also between physiological serum with VHSV injected groups ($p<0.05$). In the second week after challenge (day 35), there were significant differences ($p<0.001$) for body weight between VHSV injected groups with control and physiological injected groups ($p<0.001$). In the second week after the challenge for traits related to fish length (standard length, fork length, and total length), there were significant differences between all experimental groups ($p<0.05$). Based on the observed results, VHS disease will reduce fish growth, and it will cause economic losses.

Keyword: Rainbow trout, Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, Growth

مقدمه

ماهیان سردآبی در بین انواع گونه‌های ماهیان جایگاه مهمی دارند، مخصوصاً قزل آلای رنگین کمان به علت طعم لذیذ و بازار پسندی آن بسیار مورد توجه قرار گفته است (۱۰). تولید و تکثیر میلیون‌ها قطعه بچه ماهی به صورت تجاری و پرورش آن‌ها در مزارع نیازمند مدیریت صحیح پرورشی از نظر ژنتیک و اصلاح نژاد و توجه به بیماری‌ها می‌باشد. اما متأسفانه مسائلی از قبیل حفظ بانک ژن، دورگه‌گیری و جلوگیری از هم‌خونی چندان مورد توجه پرورش دهندگان قرار نمی‌گیرد. تکثیر غیر علمی و غیر اصولی سبب ایجاد اختلالات ژنتیکی و هم‌خونی در نسل مولدین و بروز صفات نامطلوب ناشی از آن می‌شود. ارزیابی ساختار ژنتیکی و آگاهی از وضعیت ژنتیکی و سلامتی گونه‌هایی که در معرض تکثیر مصنوعی قرار دارند جهت حفاظت و نگهداری آن-ها امری ضروری می‌باشد (۱۴). قزل آلای رنگین کمان مهم‌ترین گونه پرورشی آزاد ماهیان در ایران است. این گونه ماهی بومی کشور نبوده بلکه خاستگاه بیشتر نژادهای ماهی قزل آلای رنگین کمان از رودخانه مک کلوود کالیفرنیا می‌باشد که در سراسر جهان پراکنده شده است (۳ و ۴).

پرورش و تکثیر ماهی قزل آلا در سال‌های اخیر به سرعت توسعه یافته است. در مزارع پرورشی میزان تولید در واحد سطح رشد چشم‌گیری داشته است. هم زمان با چنین توسعه‌ای که افزایش تراکم ماهی در واحد سطح را به همراه دارد انواع بیماری‌های عفونی در ماهیان پرورشی بروز و گسترش خواهد یافت. برای مثال ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده (VHSV) به عنوان عامل اصلی و از بیماری‌های جدی، هم در ماهیان پرورشی صنعتی و هم در ماهیان حیات وحش در نیم کره شمالی گزارش شده است. تا اوایل سال ۱۹۹۰ اعتقاد بر این بود که این بیماری، تنها عامل مرگ و میر شدید در قزل آلای رنگین کمان پرورشی در قاره اروپاست. این بیماری به یکی از جدی‌ترین معضلات در کشورهای اروپایی تبدیل شده است و در حدود ۴۰ میلیون پوند در سال ۱۹۹۱خسارت وارد نموده است (۹). شیوع بیماری در دو مزرعه در دانمارک در سال ۲۰۰۰ موجب

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی و بیماری ۱۶۵ تن ماهی قزل آلای رنگین کمان و خاویار شده و میزان خسارات حدود ۲۱۱ هزار یورو تخمین زده شد، در کل میزان مرگ و میر در مزارع پرورش ماهی ۵۰ درصد بوده است (۱۳). با این حال در سه دهه گذشته این ویروس در بیش از ۸۰ گونه‌ی ماهیان در آمریکای شمالی، شمال شرق آسیا و اروپا جداسازی شده است. ویروس بیماری (VHS) می‌تواند به چهار نوع ژنوتیپ و تعدادی زیر سویه که توزیع جغرافیایی محدود دارند تقسیم شود. محدوده میزبانی و دامنه بیماری‌زایی این بیماری به نظر می‌رسد تا حدودی مرتبط با نوع ژنوتیپ ویروس بیماری باشد (۹). ویروس عامل سپتی سمی خونریزی دهنده دارای هسته شامل RNA می‌باشد. این ویروس متعلق به خانواده Rhabdoviridae و جنس Novirhabdovirus می‌باشد (۱۷). ژنوم این ویروس ۱۱-۱۲ کیلو باز نوکلئوتید طول دارد و ۵ پروتئین ساختاری را کد می‌کند. ماهی قزل آلا حساس‌ترین گونه در بین آبزیان نسبت به این بیماری می‌باشد. این بیماری مختص ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی بوده و موجب تخریب پوشش اندوتلیال شده و علایم بالینی آن شامل خونریزی در منتز، سطوح سروزی، عضلات، اندام‌های داخلی، چشم، گزروفتالمیا، تیرگی بدن و رنگ پریدگی آبشش‌ها است. همگام با این بیماری آسیت نیز قابل مشاهده می‌باشد. ماهیان مبتلا به بیماری آرام، بی تحرک و بی حال هستند. در مراحل مزمن بیماری تیرگی رنگ و رفتارهای غیر عادی هنگام شنا قابل مشاهده است (۱۸). میزان مرگ و میر به سن ماهی بستگی دارد، در ماهیان کم سن تا ۱۰۰ درصد و در ماهیان مسن‌تر از ۳۰ تا ۷۰ درصد متغیر است. مخازن بیولوژیکی بیماری، ماهیان مبتلا و دارای علایم بالینی و ماهیان حامل بیماری در حیات وحش هستند. ویروس بیماری همراه با ادرار و مایعات تخمدان به بیرون می‌ریزد. کلیه و طحال ماهی مکان‌هایی هستند که بیشترین میزان آلودگی این ویروس در آنها یافت می‌شود (۱۸). این دو بافت در ماهی قزل آلای رنگین کمان، بافت هدف این بیماری محسوب می‌شوند. هنگام بروز و انتشار بیماری در یک گله ماهی پرورشی در یک حوضه آبی، بسیاری از ماهیان ممکن است حامل بیماری باشند اما علایم بیماری را نشان ندهند.

تا سال ۱۹۸۸ خبری از بیماری (VHS) نبود تا هنگامی که در مایعات تخمدان ماهی شینوک و ماهی سالمون در آمریکا شناسایی شد و در بخش‌های وسیع ساحلی در کشورهای انگلستان، نروژ، فنلاند، ایرلند، سوئد و بخش‌هایی از دانمارک، فرانسه، آلمان، اسپانیا این بیماری به طور رسمی شناسایی شد (۲). این بیماری موجب مرگ و میر زیادی در ماهیان می‌شود و در چندین آزمون این بیماری عفونی در ماهی قزل‌آلا رنگین کمان در آبزیان اروپای شمالی و آمریکای شمالی جداسازی و شناسایی شده است (۹). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که بیماری در یک دوره‌ی ۳۰ روزه در حدود ۲۰ درصد موجب مرگ و میر ماهیان قزل آلای رنگین کمان در آمریکای شمالی شده است. در برخی گزارش‌ها میزان مرگ و میر ماهیان قزل آلای مبتلا به بیماری و ساکن آب‌های شیرین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد ذکر شده است (۱۲). اولین مورد تأیید شیوع این بیماری در شمال ایران در رودسر استان گیلان در سال ۲۰۰۵ گزارش شد (۸).

VHSV از گونه ماهیان آبزی وحشی منشأ گرفته که نسبت به ماهی قزل آلای رنگین کمان و ماهی سالمون آتلانتیک کمتر دچار بیماری می‌شوند اگر چه چندین گونه‌ی مستعد بیماری در سپرماهی نیز شناسایی شده است (۱۳). در یک دوره ۱۵ ساله، بیماری در بسیاری از گونه‌های آبزیان شناسایی و جداسازی شده است. این بیماری ۴۸ گونه آبزیان را در کره شمالی بطور عمده در کشورهای ایالات متحده، کانادا، ژاپن، کره و اروپا تحت تأثیر قرار داده است (۱۵). محققان با جمع آوری نمونه‌های ماهیان آلوده به بیماری (VHS) از شش استان ایران با تولید عمده ماهی قزل آلا رنگین کمان و بیشترین میزان مرگ و میر در اثر این بیماری، به بررسی این عامل بیماری‌زا پرداختند. میزان مرگ و میر دسته جمعی ماهیان در مزارع با علائم مثبت بیماری، حدود ۳۰ تا ۷۰ درصد بود. علایم این بیماری شامل اگزوفتالمیا، خونریزی در فک پایین و چشم‌ها، ورم شکم، تیره شدن پوست، گسترش نواحی عضلانی و پیلوریک، تراکم شدید و بزرگ شدگی کلیه و کبد بود. همچنین آزمایشات هیستوپاتولوژیک نشان داد که ضایعات ایجاد شده در کبد و جگر به وسیله بیماری مشابه علایم ذکر شده برای بیماری بود. بنابراین در بافت‌های آسیب دیده که تحت اثرات سیتوپاتیک قرار گرفته‌اند سلول‌ها جداسازی و هموژنیزه شدند، تأیید تشخیص عارضه (VHS) به وسیله ی واکنش‌های RT-PCR انجام گرفت. طبق نتایج این پژوهش خاستگاه این بیماری ایجاد شده در مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان ایرانی، اروپا بوده است (۱). در پژوهشی دیگر محققان با استفاده از تکنیک ELISA و تست RT-PCR real-time موفق به شناسایی یک سویه جدید ویروس بیماری سپتی سمی هموراژیک در ماهیان وحشی اطراف مزارع ایسلند شدند. آنالیز فیلوژنی توالی گلیکوپروتئینی ویروس نشان داد که سویه جدید احتمالا متعلق به ژنوتیپ IV بیماری است. این اولین گزارش پروژه جداسازی زیر گروه IV ویروس در مزارع ایسلند و کشورهای اروپایی می‌باشد (۷).

پژوهش‌گران با بررسی توالی کامل و دقیق ویروس بیماری VHS نشان دادند که ژنوتیپ Ia ویروس بیشتر در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان کشورهای اروپایی و ژنوتیپ IVb ویروس در مناطق آبی ایالات متحده وجود دارد. توالی کامل VHSV-Ia شناسایی و در بانک ژن با شماره دسترسی KC۷۷۸۷۷۴ قرار داده شده و توالی نوکلئوتیدی آن ۱۳ درصد متفاوت از سویه‌های آمریکایی است (۱۹). تحقیقات آنالیز فیلوژنی ویروس سپتی سمی هموراژیک نشان داد که سویه بیماری‌زای ویروس در ایران متعلق به کلاد Ia۲ و ژنوتیپ Ia ویروس می‌باشد. در نهایت نشان داده شد که ژنوتیپ ویروس در کشور از نظر ژنوتیپی حدود ۹۹ درصد مشابه سویه های اروپایی (یافت شده در ایتالیا) می باشد(۵).

هدف از پژوهش حاضر باتوجه به عدم بررسی اثر مستقیم بیماری بر وزن بدن و تغییرات طول بدن ماهیان تا به حال، بررسی تغییرات پارامترهای بیومتری در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بعد از انجام دوره‌ی چالشی تزریق در سطوح مختلف بیماری ویروسی سپتی سمی هموراژیک (VHS) بود.

مواد و روش‌ها

اصول اخلاقی پژوهش

کلیه ماهیان مورد استفاده در این پژوهش با توجه به دستورالعمل، حقوق و آسایش آبزیان مطابق منشور سازمان دامپزشکی کشور پرورش یافتند. چالش ویروسی در این پژوهش با توجه به نظارت مستقیم و موارد ایمنی

www.SID.ir

Archive of SID

زیستی زیر نظر متخصصان بیماری‌های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور انجام شد.

مکان و زمان پژوهش

این پژوهش در بخش پرروش آبزیان، مرکز رشد و کارآفرینی، دانشگاه آزاد واحد رودهن واقع در شهرستان رودهن از توابع استان تهران در اواخر پاییز (آذر ماه) و زمستان (دی ماه) سال ۱۳۹۷ شمسی انجام شد.

مزرعه پرورش آبزیان رودهن

مرکز پرورش آبزیان مرکز رشد و کارآفرینی دانشگاه آزاد رودهن با موقعیت جغرافیایی (۳۵ درجه شمالی و ۵۱ درجه شرقی)، در ۳۰ کیلومتری شرق تهران و در شهرستان دماوند واقع شده است. رودهن از شمال با شهرستان آمل در استان مازندران، از شرق با بخش مرکزی دماوند، از غرب با شهرستان پردیس و از جنوب با کوه‌ها و کویرهای ورامین و پاکدشت همسایه است. کلیه تانک‌های پرورش ماهی فایبرگلاس با ابعاد (عرض ۴۵ سانتی‌متر، طول ۶۰ سانتی متر و ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر بودند. مقدار توده‌ی پرورش مورد استفاده در هر تانک ۱/۷ کیلوگرم بود.

کیفیت شیمیایی و فیزیکی آب

آب مورد استفاده در این پژوهش از آب چاه تأمین شد. این آب ابتدا در تانک ۵۰۰۰ لیتری فایبرگلاس دوجداره عایق ذخیره و سپس استفاده می‌شد. دمای آب در دوره‌ی پرورش به طور میانگین ۱۰ درجه سانتی‌گراد، pH آب اندازه گیری شده با کیت کاریزآب (http://www.karizab.com) ۷/۵، شوری ۳ قسمت در میلیون، اکسیژن محلول در آب ۱۰/۲میلی‌لیتر در لیتر و میزان آمونیاک ۰/۷۲ ارزیابی شد.

طراحی آزمایش

در این پژوهش ۳۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نژاد تروتلاج آمریکایی (۱۷ قطعه ماهی در هر تانک) به مدت پنج هفته نگهداری شدند. دوره‌ی عادت‌دهی ماهیان ۱۸ روز بود و در نهایت پس از کسر تلفات ماهیان ۲۸۱ قطعه ماهی جهت تیماربندی باقی ماندند و غذادهی ماهیان بر اساس وزن توده‌ی زنده ماهیان و دمای آب براساس استانداردهای موجود و راهنمای خوراک‌دهی انجام شد. غذادهی ماهیان سه وعده در شبانه روز (صبح، ظهر و غروب) و نظافت تانک های پرورشی دوبار (صبح و شب) انجام شد. سیستم پرورش ماهی به صورت گردش آب مدار بسته بود و هر سه ساعت یک بار آب به طور خودکار به سیستم تزریق می‌شد. هوادهی ماهیان در داخل هر تانک به وسیله‌ی سنگ هوا (تغذیه شده با پمپ) و بیوفیلتر (شرکت ماهیران) انجام شد.

چالش ویروسی

بعد از سپری شدن دوره‌ی عادت دهی ماهیان در پنج گروه دسته‌بندی شدند (گروه اول تیمار با شش صدم میلی‌لیتر VHSV، گروه دوم تیمار سه صدم میلی‌لیتر VHSV، گروه سوم تیمار شش صدم میلی لیتر سرم فیزیولوژی، گروه چهارم سه صدم میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، گروه پنجم تیمار شاهد بدون تزریق). تزریق ویروس توسط سرنگ یک میلی لیتری مخصوص انسولین انجام شد.

شناسایی بیماری VHS در ماهیان

جهت شناسایی و تشخیص بیماری در ماهیان تزریق شده ۹ نمونه بافتی از بافت‌های مختلف (کلیه، کبد، عضله و طحال) از ماهیان گروه تزریق ویروس و گروه تزریق سرم فیزیولوژی جداسازی شد. تشخیص وجود بیماری با استفاده از تست RT-PCR انجام شد.

استخراج RNA ویروسی

استخراج RNA ویروسی از بافت‌های هموژن شده طحال، کلیه، کبد و عضله با استفاده از کیت استخراج RNA (یکتاتجهیز، ایران) بر اساس دستورالعمل و راهنمای شرکت سازنده صورت گرفت. RNA تا هنگام استفاده در یخچال با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تست RT-PCR جهت تشخیص بیماری

پس از استخراج RNA، جهت ایجاد cDNA، ۵ میکرولیتر RNA ویروسی، یک میکرولیتر هگزامر تصادفی به همراه آب دپس و ۲ میکرولیتر از RNA مربوط به هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ سرد شدند. سپس به مخلوط بالا ۵ میکرولیتر RT buffer، ۲ میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر آنزیم RT اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از دستگاه گرادیانت (ساخت انگلیس) مستر با حجم ۵۰ میکرولیتر دارای

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز.

ترتیب توالی	توالی	نام ژن
‘۳ ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG‘۵	توالی رفتF	VHSV N
‘۳ GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC‘۵	توالی برگشتR	

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- نمونه ای از اندازه گیری وزن و اندازه گیری طول بدن ماهی.

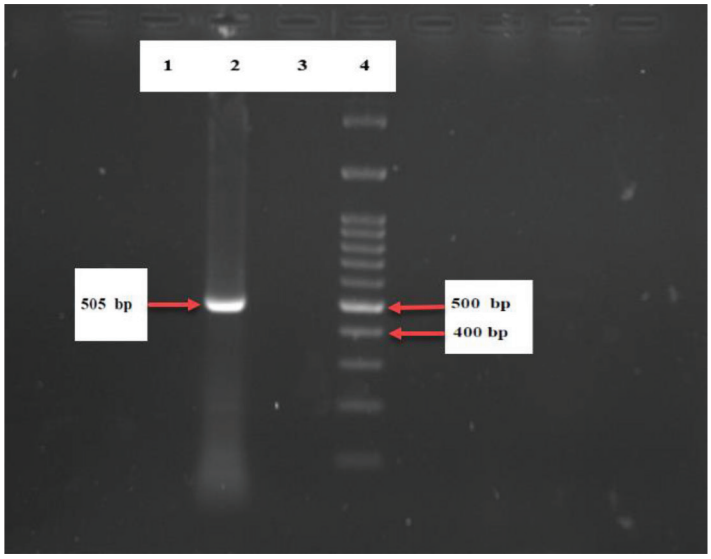
۵ میکرولیتر PCR buffer ۱۰x، یک میلی‌مول Mgcl2، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۱۰۰ پیکومول با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت، یک واحد Taq DNA polymerase و دو و نیم میکرولیتر برای نمونه‌ها استفاده شد. سیکل حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شود. جهت اطمینان از تکثیر وجود قطعه مورد نظر از ژل آگاروز ۱/۵درصد استفاده شد. جدول ۱ توالی‌های آغازگرهای مربوط به واکنش PCR بوده که از منبع شماره (۱۶) اخذ شده است.

اندازه‌گیری داده‌های بیومتری

داده‌های بیومتری شامل وزن بدن، طول استاندارد، طول چنگالی و طول کل بدن هر هفته یک مرتبه اندازه‌گیری‌شدند. تلفات به صورت روزانه ثبت و در کل دوره پرورش به مدت پنج هفته، ۲۹ قطعه ماهی تلف شدند. وزن بدن ماهیان با استفاده از ترازوی دیجیتالی دقیق مارک sartorius با دقت ۰/۰۱ و حداکثر وزن اندازه‌گیری ۲۱۰ گرم و طول ماهیان با خط کش با دقت ۰/۱ سانتی‌متر رکوردبرداری شدند.

آنالیز آماری داده‌ها

جهت بررسی و آنالیز داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلکس (Shapiro-Wilk's test) انجام سپس همگن بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون (Levene's test) بررسی شد. به منظور بررسی پارامترهای بیومتری وزن بدن، طول استاندارد، طول چنگالی و طول کل داده‌های حاصل از ماهیان قزل آلای رنگین کمان از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه



شکل۲- قطعه ۵۰۵ جفت بازی تکثیر شده به وسیله PCR. چاهک شماره۱: نمونه بدون تیمار تزریقی، چاهک شماره ۲ تیمارهای تزریق ویروس: قطعه ۵۰۵ جفت بازی مربوط به ناحیه N-geneبیماری VHSV، چاهک شماره ۳: تیمارهای تزریق سرم فیزیولوژی، چاهک شماره ۴: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت تکاپوزیست، ایران).

www.SID.ir

Archive of SID

میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی در این پژوهش از آزمون توکی (test HSD) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار R i۳۸۶ نسخه‌ی ۱,۶,۳ انجام شد.

نتایج

پنج روز پس از تزریق ویروس در ماهیان، نمونه بافتی طحال، کبد و عضله از گروه‌های مختلف شاهد، تیمار ویروسی و تیمار تزریق شده با سرم فیزیولوژی در قالب ۹ نمونه جداسازی شدند و RNA بافتی استخراج و سپس با کمک تست RT-PCR حضور ویروس در تیمارهای آزمایشی مورد تأیید قرار گرفت، با توجه به شکل ژل اگارز یک و نیم درصد، می توان گفت حضور ویروس در نمونه‌های گروه تزریق شده با ویروس کاملا قطعی بوده و همچنین در گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی و گروه شاهد اثری از ویروس مشاهد نشد (شکل ۲). در پژوهش حاضر پس اتمام دوره‌ی عادت دهی به مدت ۱۸ روز، دوره‌ی چالش قزل‌آلای رنگین کمان به مدت دو هفته به طول انجامید. گروه‌های مورد آزمایش شامل پنج گروه (گروه A= گروه تزریق شده با ویروس سپتی سمی هموراژیک سه صدم میلی‌لیتر، گروه B = گروه تزریق شده با ویروس سپتی سمی هموراژیک شش صدم میلی‌لیتر، گروه C= گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی سه صدم میلی‌لیتر، گروه D = گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی شش صدم میلی‌لیتر، گروه E = گروه شاهد (گروه بدون تزریق) بودند. پس از ثبت رکوردهای هفتگی مربوط به وزن بدن ماهیان در گروه‌های مختلف آزمایشی و ثبت شاخص های زیست سنجی بدن ماهیان که شامل اندازه گیری طول استاندارد بدن ماهی (Standard length)، طول چنگالی ماهی (Fork length) و طول کل بدن ماهی (Total length) برحسب واحد سانتی‌متر سنجش شدند (جدول‌های ۲ و ۳). در هر گروه آزمایشی ۳۰ قطعه ماهی به طور تصادفی رکوردبرداری شدند. با توجه به نتایج جدول ۱، در هفته اول چالش بیشترین مقدار افزایش وزن به طور متوسط در ماهیان گروه شاهد (گروه E فاقد هر گونه تزریق) ۱۰۸/۴۷ گرم و کمترین مقدار افزایش وزن به طور متوسط در چالش مربوط به ماهیان گروه B (گروه تزریق شده با ویروس سپتی سمی هموراژیک شش صدم میلی‌لیتر) ۱۰۴/۸۹ گرم بود. حداکثر و حداقل مقادیر ثبت شده رکورد وزن بدن در انتهای هفته اول چالش در گروه E، به ترتیب ۱۱۴/۳۹ و ۱۰۱/۷۵ گرم بود. حداکثر و حداقل مقادیر ثبت

جدول۱- خلاصه ای از نتایج زیست سنجی وزن ماهی در هفته اول و هفته دوم چالش.

پارامتر	انحراف معیار ± میانگین	حداقل مقادیر	حداکثر مقادیر	ضریب تغییرات (CV%)
وزن هفته اول چالش گروه E (گرم)	۱۰۸/۴۷ ± ۲/۹۹	۱۰۱/۷۵	۱۱۴/۳۹	۲/۷۵
وزن هفته اول چالش گروه D (گرم)	۱۰۷/۰۸ ± ۲/۹۲	۹۹/۹۷	۱۱۲/۶۱	۲/۷۲
وزن هفته اول چالش گروه C (گرم)	۱۰۷/۱۹ ± ۳/۰۶	۹۸/۷۴	۱۱۲/۸۹	۲/۸۵
وزن هفته اول چالش گروه B (گرم)	۱۰۴/۸۹ ± ۳/۰۶	۹۷/۵۰	۱۱۰/۴۹	۲/۹۱
وزن هفته اول چالش گروه A (گرم)	۱۰۵/۷۵ ± ۳/۷۵	۹۶/۴۹	۱۱۲/۵۴	۳/۵۴
وزن هفته دوم چالش گروه E (گرم)	۱۱۴/۶۵ ± ۳/۰۹	۱۰۸/۱۳	۱۱۹/۸	۲/۶۹
وزن هفته دوم چالش گروه D (گرم)	۱۱۳/۵۷ ± ۳/۲۳	۱۰۶/۷	۱۱۸/۷	۲/۸۴
وزن هفته دوم چالش گروه C (گرم)	۱۱۳/۲۱ ± ۳/۱۸	۱۰۶/۹۵	۱۱۸/۹۸	۲/۸۰
وزن هفته دوم چالش گروه B (گرم)	۱۰۹/۹۲ ± ۳/۰۰	۱۰۱/۷۹	۱۱۵/۴۲	۲/۷۹
وزن هفته دوم چالش گروه A (گرم)	۱۰۹/۸۱ ± ۲/۹۰	۱۰۲/۴۱	۱۱۵/۲۴	۲/۶۴

E=گروه شاهد (تیمار بدون تزریق)

D=گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی شش صدم میلی لیتر

C = گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی سه صدم میلی لیتر

B = گروه تزریق شده با ویروس شش صدم میلی لیتر

A = گروه تزریق شده با ویروس سه صدم میلی لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

شده رکورد وزن بدن در در انتهای هفته اول چالش در گروه B به ترتیب، ۱۱۰/۴۹ و ۹۷/۵۰ بود.

با توجه به جدول ۱ در هفته دوم چالش، بیشترین مقدار افزایش وزن به طور متوسط مربوط به گروه E، ۱۱۴/۶۵ گرم و کمترین میزان افزایش وزن در هفته دوم چالش به طور متوسط مربوط به گروه A، ۱۰۹/۸۱ بود. حداکثر و حداقل مقادیر ثبت شده رکورد وزن بدن در انتهای هفته دوم چالش در گروه E، به ترتیب ۱۱۹/۸ و ۱۰۸/۱۳ گرم بود. حداکثر و حداقل مقادیر ثبت شده رکورد وزن بدن در انتهای هفته دوم چالش در گروه A، به ترتیب ۱۱۵/۲۴ و ۱۰۲/۴۱ گرم بود. با توجه به داده‌های به دست آمده در طی مدت دو هفته چالش برای صفت وزن بدن بیشترین مقادیر افزایش وزن در گروه E (گروه شاهد) و کمترین مقادیر مربوط به افزایش وزن مربوط به گروه‌های B و A (گروه های تزریق ویروس) بوده است.

در انتهای هفته اول و دوم چالش هم زمان با رکوردبرداری وزن ماهیان داده‌ها و اندازه‌گیری های مربوط طول بخش‌های مختلف بدن ماهیان از جمله (طول استاندارد، طول چنگالی و طول کلی بدن ماهیان) نیز ثبت و رکوردبرداری شد (شکل ۱). به عنوان نمونه در جدول ۲- رکوردهای مربوط به اندازه‌گیری طول کل بدن ماهی (Total length) ذکر شدند. در انتهای هفته اول چالش حداکثر مقدار طول کل بدن ماهی به طور متوسط مربوط به گروه E، ۲۰/۴۶ سانتی‌متر و حداقل مقدار طول کل بدن ماهی به طور متوسط مربوط به گروه A، ۲۰/۱۸ سانتی‌متر بود. حداکثر و حداقل مقادیر رکوردی ثبت شده برای صفت طول کل بدن ماهی در هفته اول چالش در گروه E، به ترتیب ۲۱/۶ و ۱۹/۵ سانتی‌متر بود. حداکثر و حداقل مقادیر رکوردی ثبت شده برای صفت طول کل بدن ماهی گروه A در هفته اول چالش در گروه به ترتیب ۲۱ و ۱۹/۴سانتی متر بود.

مقادیر اندازه‌گیری شده برای صفت طول کل بدن ماهی در هفته دوم چالش نیز ثبت و بررسی شدند. با توجه به مقادیر ثبت شده در جدول ۲- ، نشان می‌دهد که حداکثر مقدار ثبت شده به طور متوسط ۲۰/۹۵ سانتی‌متر و مربوط به گروه E و حداقل مقدار ثبت شده به طور متوسط ۲۰/۱۸ سانتی‌متر و مربوط به گروه A بود. همچنین حداکثر و حداقل مقدار رکورد طول کل بدن در هفته دوم چالش برای گروه E به ترتیب برابر ۲۲/۲ و ۱۹/۶ سانتی‌متر بود. حداکثر و حداقل مقدار رکورد طول کل بدن ماهی در هفته دوم چالش برای گروه A، به ترتیب ۲۱/۵ و ۱۹

جدول ۲- خلاصه ای از نتایج زیست سنجی طول کل ماهی در هفته اول و هفته دوم چالش تزریق.

پارامتر	انحراف معیار ± میانگین	حداقل مقادیر	حداکثر مقادیر	ضریب تغییرات (CV%)
TL هفته اول چالش گروه E (سانتی متر)	۲۰/۴۶ ± ۰/۵۷	۱۹/۵	۲۱/۶	۲/۷۸
TL هفته اول چالش گروه D (سانتی متر)	۲۰/۳۶ ± ۰/۸	۱۹/۴	۲۱/۲	۳/۹۲
TL هفته اول چالش گروه C (سانتی متر)	۲۰/۳۹ ± ۰/۴۹	۱۹/۵	۲۱/۳	۲/۴
TL هفته اول چالش گروه B (سانتی متر)	۲۰/۲۴ ± ۰/۵۵	۱۹/۳۰	۲۱/۱	۲/۷۱
TL هفته اول چالش گروه A (سانتی متر)	۲۰/۱۸ ± ۰/۴۸	۱۹/۴	۲۱	۲/۳۷
TL هفته دوم چالش گروه E (سانتی متر)	۲۰/۹۵ ± ۰/۷۷	۱۹/۶	۲۲/۲	۳/۶۷
TL هفته دوم چالش گروه D (سانتی متر)	۲۰/۷۹ ± ۰/ ۷۹	۱۹/۴	۲۲	۳/۷۹
TL هفته دوم چالش گروه C (سانتی متر)	۲۰/۷۶ ± ۰/۸۰	۱۹/۵	۲۲	۳/۸۵
TL هفته دوم چالش گروه B (سانتی متر)	۲۰/۳۴ ± ۰/۷۴	۱۸/۴	۲۱/۴	۳/۶۳
TL هفته دوم چالش گروه A (سانتی متر)	۲۰/۲۶ ± ۰/۶۴	۱۹	۲۱/۵	۳/۱۵

E=گروه شاهد (تیمار بدون تزریق)

D=گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی شش صدم میلی لیتر

C = گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی سه صدم میلی لیتر

B = گروه تزریق شده با ویروس شش صدم میلی لیتر

A = گروه تزریق شده با ویروس سه صدم میلی لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی متر بود.

با توجه به مقادیر رکوردبرداری شده در مورد صفت طول کل بدن، در جدول ۲ بیانگر آن ست که طول کل بدن ماهیان بدون تزریق (گروه شاهد) بیشترین مقدار و طول کل بدن ماهیان گروه تیمار تزریق ویروس کمترین مقدار را دارا بوده‌اند. در ادامه با توجه به وجود رکوردهای مربوط به وزن بدن ماهی و طول بخش‌های مختلف بدن ماهی در دو هفته چالش در پنج گروه مختلف با استفاده از آزمون توکی در محیط نرم‌افزار R مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از زیست سنجی داده‌های مربوط به وزن بدن ماهیان در انتهای هفته اول چالش نشان داد که بین تیمار گروه شاهد (E) با گروه تیمار تزریق ویروس سه صدم میلی‌لیتر (گروه A)، بین تیمار گروه شاهد (E) و گروه شش صدم میلی‌لیتر تزریق ویروس (گروه B) اختلاف معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد. همچنین بین گروه تیمار شش صدم میلی‌لیتر ویروس (گروه B) و گروه تیماری سه صدم میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (گروه C) اختلاف معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵)وجود داشت. در مورد مقایسه میانگین پنج گروه تیماری مختلف در مورد اندازه‌گیری‌های زیست‌سنجی مربوط به صفات طول استاندارد، طول چنگالی و طول کلی بدن ماهیان در هفته اول چالش اختلاف معنی‌داری یافت نشد (جدول ۳).

بررسی و مقایسات میانگین صفت وزن بدن در انتهای هفته دوم چالش نشان داد که بین گروه (E) با گروه (A)، بین گروه (E) با گروه (B)، بین گروه (D) با گروه (A)، بین گروه (D) با گروه (B)، بین گروه (C) با گروه (A) و بین گروه (C) با گروه (B) در سطح (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳). در رابطه صفات طول استاندارد و طول چنگالی در هفته دوم چالش نیز بین گروه (E) با گروه (A)، بین گروه (E) با گروه (B)، بین گروه (D) با گروه (A)، بین گروه (D) با گروه (B)، بین گروه (C) با گروه (A) و بین گروه (C) با گروه (B) در سطح (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در رابطه بررسی طول کل بدن ماهی در هفته دوم چالش بین بین گروه (E) با گروه (A)، بین گروه (E) با گروه (B) در سطح (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۳).

بطور خلاصه نتایج مقایسات میانگین بین گروه‌های ویروسی، گروه شاهد و گروه سرم فیزیولوژی نشان می‌دهد در انتهای هفته اول اختلاف معنی‌دار فقط در صفت وزن بدن دیده می‌شود و بر صفات طول بدن اثر معنی‌دار مشاهده نشد ولی در هفته دوم چالش اختلاف معنی‌دار هم در صفت وزن بدن و هم در صفات طول بدن مشاهده شد، لذا با توجه به نتایج می‌توان احتمال داد که بروز بیماری نقش مؤثری در کاهش رشد، کاهش صفات وزن بدن و رشد طولی ماهی خواهد داشت. جهت بررسی دقیق‌تر معنی‌داری صفات مختلف مطابق نتایج بدست آمده در جدول

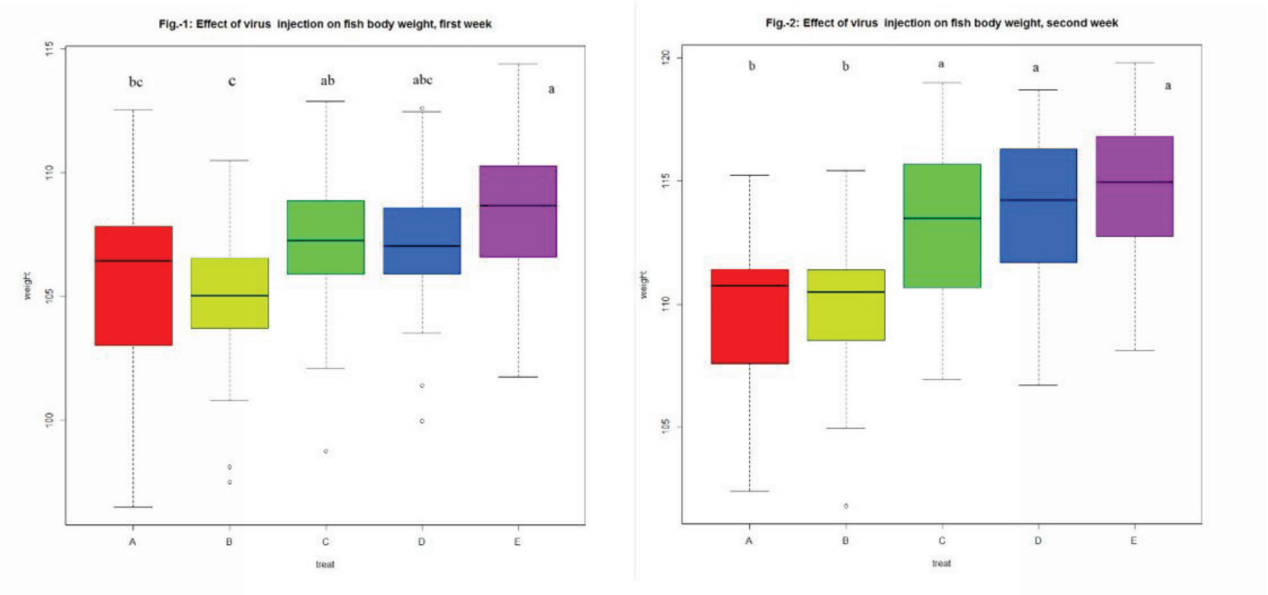
جدول ۳- بررسی شاخص های بیومتری ماهی قزل آلای رنگین کمان تزریق شده با ویروس VHSV و سرم فیزیولوژی (میانگین ± انحراف معیار) .

پارامتر	هفته اول چالش				
	شاهد (n=۳۰)(E)	سرم فیزیولوژی شش صدم میلی لیتر (n=۳۰)(D)	سرم فیزیولوژی سه صدم میلی لیتر (n=۳۰)(C)	ویروس شش صدم میلی لیتر (n=۳۰)(B)	ویروس سه صدم میلی لیتر (n=۳۰)(A)
وزن نهایی (گرم)	۱۰۸/۴۷ ± ۲/۹۹ a	۱۰۷/۰۸ ± ۲/۹۲ abc	۱۰۷/۱۹ ± ۳/۰۶ ab	۱۰۴/۸۹ ± ۳/۰۶ c	۱۰۵/۷۵ ± ۳/۷۵ bc
طول استاندارد (سانتی متر)	۱۸/۳۵ ± ۰/۳۵ a	۱۸/۳۴ ± ۰/۲۵ a	۱۸/۳۸ ± ۰/۲۷ a	۱۸/۲۸ ± ۰/۲۷ a	۱۸/۲۷ ± ۰/ ۳۱ a
طول چنگالی (سانتی متر)	۱۹/۰۵ ± ۰/۳۸ a	۱۸/۹۳ ± ۰/۳۸ a	۱۸/۹۷ ± ۰/۳۲ a	۱۸/۹۰ ± ۰/۳۲ a	۱۸/۹۲ ± ۰/ ۳۲ a
طول نهایی (سانتی متر)	۲۰/۴۶ ± ۰/۵۷ a	۲۰/۳۶ ± ۰/۸ a	۲۰/۳۹ ± ۰/۴۹ a	۲۰/۲۴ ± ۰/۵۵ a	۲۰/۱۸ ± ۰/۴۸ a
	هفته دوم چالش				
وزن نهایی (گرم)	۱۱۴/۶۵ ± ۳/۰۹ a	۱۱۳/۵۷ ± ۳/۲۳ a	۱۱۳/۲۱ ± ۳/۱۸ a	۱۰۹/۹۲ ± ۳/۰۰ b	۱۰۹/۸۱ ± ۲/۹۰ b
طول استاندارد (سانتی متر)	۱۹/۰۷ ± ۰/۴۹ a	۱۸/۹۰ ± ۰/۵۱ a	۱۸/۸۳ ± ۰/۵۴ a	۱۸/۲۹ ± ۰/۴۵ b	۱۸/۲۸ ± ۰/۴۳ b
طول چنگالی (سانتی متر)	۱۹/۶۸ ± ۰/۶۰ a	۱۹/۵۴ ± ۰/۶۱ a	۱۹/۴۹ ± ۰/۶۵ a	۱۸/۷۳ ± ۰/۴۵ b	۱۸/۹۴ ± ۰/۵۱ b
طول نهایی (سانتی متر)	۲۰/۹۵ ± ۰/۷۷ a	۲۰/۷۹ ± ۰/ ۷۹ ab	۲۰/۷۶ ± ۰/۸۰ ab	۲۰/۳۴ ± ۰/۷۴ b	۲۰/۲۶ ± ۰/۶۴ b

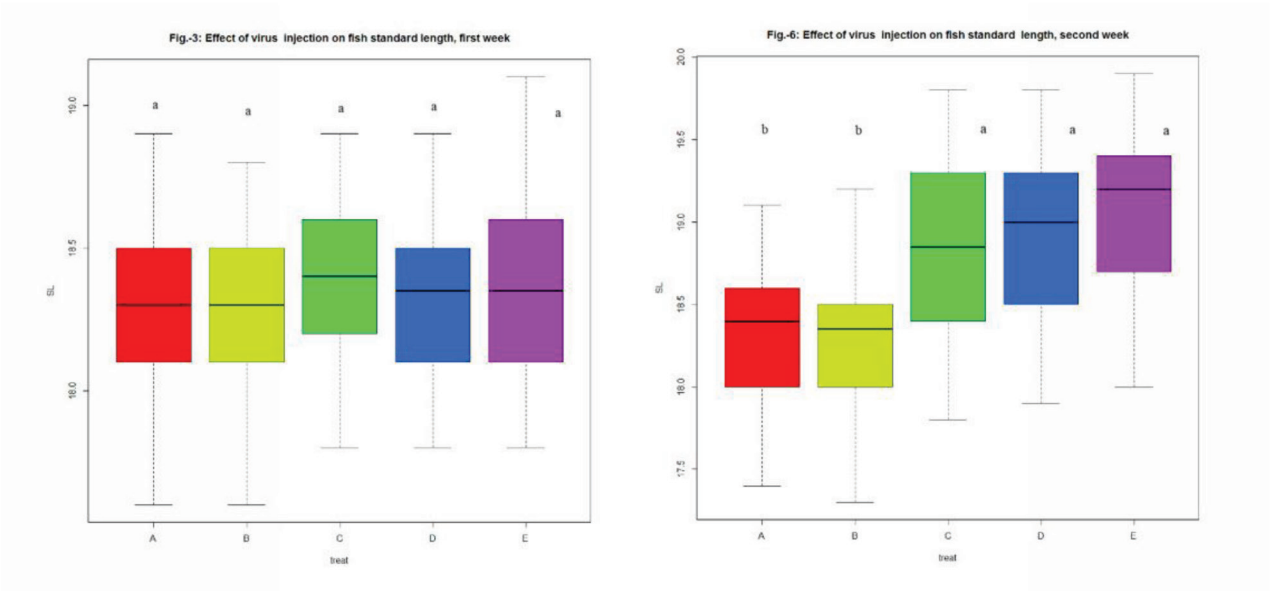
اعداد دارای حروف یکسان در یک ردیف فاقد اختلاف آماری معنی دار در سطح P<۰/۰۵ می باشند.

www.SID.ir

Archive of SID



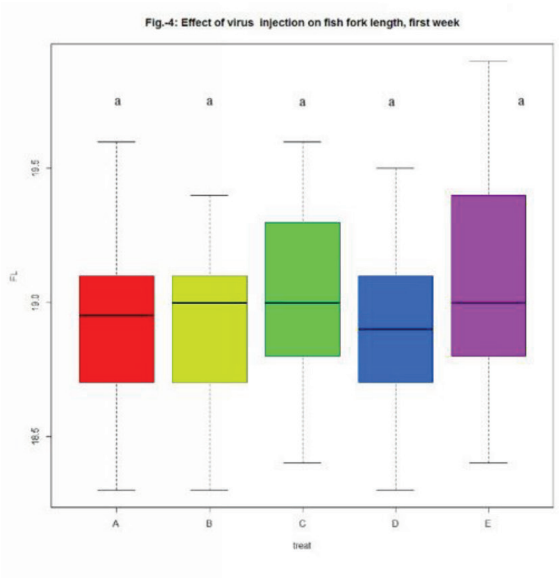
شکل ۳- بررسی و مقایسه زیست سنجی تأثیر تزریق ویروس VHSV و سرم فیزیولوژی بر وزن بدن ماهی در هفته اول و دوم چالش.

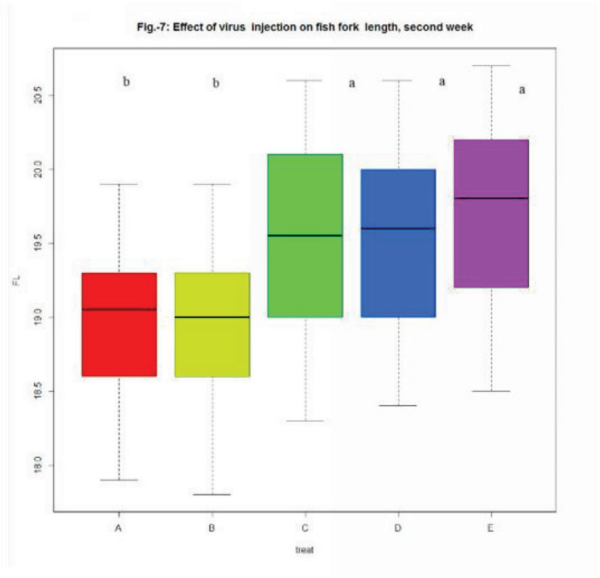


شکل ۴- بررسی و مقایسه زیست سنجی تأثیر تزریق ویروس VHSV و سرم فیزیولوژی بر اندازه طول استاندارد بدن ماهی در هفته اول و دوم چالش.

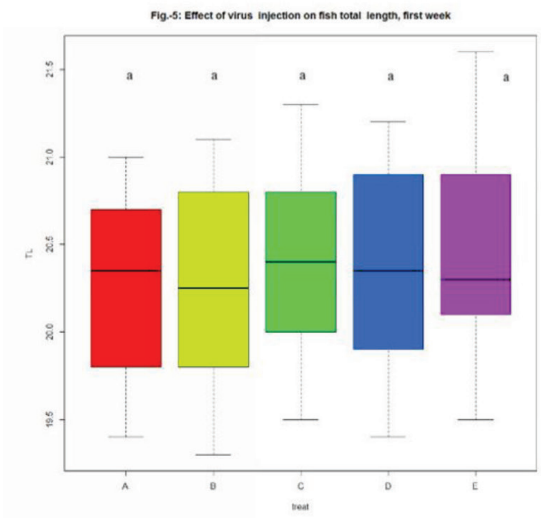
www.SID.ir

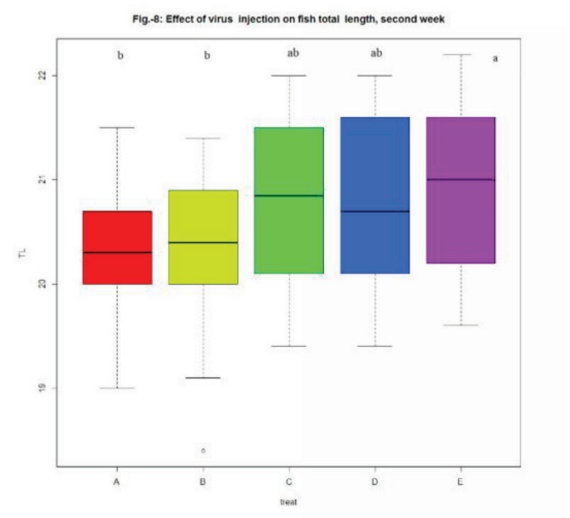
Archive of SID





شکل ۵- بررسی و مقایسه زیست سنجی تأثیر تزریق ویروس VHSV و سرم فیزیولوژی بر اندازه طول چنگالی بدن ماهی در هفته اول و دوم چالش.





شکل ۶- بررسی و مقایسه زیست سنجی تأثیر تزریق ویروس VHSV و سرم فیزیولوژی بر اندازه طول کل بدن ماهی در هفته اول و دوم چالش.

www.SID.ir

Archive of SID

۳ بصورت باکس پلات و همچنین معنی‌داری آن‌ها با حروف کوچک لاتین در بالای هر پلات در محیط نرم‌افزار R ترسیم شد که در ادامه در شکل‌های (۳، ۴ ، ۵ و ۶) به راحتی قابل مشاهده و بررسی هستند.

بحث

با توجه به بررسی منابع علمی مختلف می‌توان گفت که رشد ماهی تحت تاثیر سن قرار می گیرد، افزایش یا کاهش وزن در تناسب و ارتباط با طول بدن ماهی است (۶ و ۱۲). بنابراین بررسی پارامترهای مربوط به رشد و اندازه ماهی مانند افزایش وزن دوره‌ای و بررسی تغییرات طول بدن می‌تواند در شرایط مختلف زندگی آبزیان (بیماری، سلامت یا تغذیه با جیره غذایی خاص) نتایج مفیدی جهت پرورش‌دهندگان و بخش صنعت را به دنبال داشته باشد. در سال‌های اخیر واردات تخم چشم زده به داخل کشور منجر به شیوع بیماری خطرناک سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) در مزارع پرورش‌دهنده‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شده و تلفات زیاد و زیان اقتصادی کلانی را به صنعت شیلات کشور وارد نموده است. از آنجا که این بیماری اکثر گونه‌های آبزیان را درگیر نموده و در این بین قزل‌آلای رنگین کمان حساس‌ترین گونه‌ی ماهی نسبت به این بیماری است، لذا توجه به کنترل بیماری و پیشگیری از آلودگی‌ها در مزارع مهم‌ترین عامل موفقیت پرورش دهندگان می‌باشد. با توجه به بررسی منابع مختلف علمی اثر تزریق ویروس این بیماری بر وزن بدن و پارامترهای طول بدن تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به نمونه‌برداری در دو هفته چالش بیماری همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین اثر بیماری بر صفت وزن بدن ماهیان بود که این مسئله از اهمیت بالایی برخوردار است و نشان دهنده‌ی آنست که وجود پاتوژن در گله تاثیر بسیار زیادی بر میزان رشد و افزایش وزن توده ماهیان خواهد داشت. در شکل ۴ مشاهده می‌شود که در هفته اول چالش بیماری اثر چندانی بر طول استاندارد ماهیان نداشته است اما در هفته دوم چالش بین گروه‌های بیمار و غیر بیمار تفاوت چشمگیری وجود دارد. به طوری که کاهش رشد در وزن و طول ماهیان تا حدود بیشتری در هفته دوم چالش رخ داده است و احتمالا می‌توان انتظار داشت با ماندگاری ویروس در گله، هم وزن و هم طول استاندارد ماهیان تحت تأثیر قرار گرفته است. الگوی تأثیر طول چنگالی در هفته اول و دوم چالش مشابه الگوی اثر بیماری بر طول استاندارد بوده و گروه‌های بیمار کاهش بیشتر نشان داده‌اند. طول کل ماهیان نیز در هفته اول تغییر چندان محسوسی نداشته است ولی در هفته دوم چالش اثرات خود را نشان داده و میزان کاهش آن در گروه‌های آلوده به ویروس بیشتر از سایر گروه‌ها بوده است. بنابراین به طور کلی می‌توان بیان نمود که ماهیان بیمار یا حامل ویروس الگوی رشد کاهشی را هم در وزن و هم در صفات مرتبط به طول نشان دادند و این موضوع برای پرورش‌دهندگان ماهی در مزارع صنعتی بسیار حائز اهمیت است چرا که در این صورت زیان اقتصادی زیادی را به دنبال خواهد داشت.

در ایران اولین مورد تأیید شیوع این بیماری در شمال کشور در رودسر استان گیلان در سال ۲۰۰۵ گزارش شد (۸). پژوهشگران با بررسی مولکولی بیماری VHS در ماهی قزل آلای رنگین کمان ایران در ۱۰۰ مزرعه پرورشی در ۱۰ استان کشور به بررسی و شناسایی و تشخیص هر چه بیشتر این بیماری پرداختند. نمونه‌های بدست آمده برای غربالگری و تست‌های آزمایشگاهی پاتولوژیکی و مولکولی از بافت‌های جگر، طحال، کلیه، قلب، روده و پانکراس ماهی‌های آلوده به ویروس بیماری VHS جداسازی شدند. در این تحقیق از ۱۰۰ مزرعه پرورشی استفاده شد که ۱۵ مزرعه پرورشی دارای علایم پاتولوژیک مثبت و ۱۰ تا از این ۱۵ مرکز دارای علایم مثبت بیماری VHS بودند که با آزمون nested-PCR مورد سنجش قرار گرفته بودند (۸). در این تحقیق نیز از بافت‌های طحال، کلیه و عضله جهت تشخیص وجود بیماری استفاده شد و نتیجه آزمون مثبت بود بنابراین می‌توان گفت بافت طحال و کلیه کاندیداهای بسیار خوبی جهت تشخیص و بررسی بیماری هستند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده این واقعیت است که کنترل و تشخیص به موقع این بیماری در بیشتر مناطق کشور برای توسعه صنعت آبزی‌پروری در ایران بسیار حیاتی می‌باشد در پژوهش حاضر نیز آثار زیان‌بار این بیماری بر رشد ماهیان و زیان اقتصادی حاصل از آن تأیید شد.

محققان با جمع‌آوری نمونه‌های ماهیان آلوده به بیماری (VHS) از شش استان ایران با تولید عمده ماهی قزل‌آلا رنگین کمان و دارای بیشترین میزان مرگ و میر در اثر این بیماری، به بررسی این عامل بیماری‌زا پرداختند. میزان مرگ و میر دسته جمعی ماهیان در این مزارع که علائم مثبت بیماری را نشان دادند، حدود ۳۰ تا ۷۰ درصد بود. تأیید تشخیص عارضه (VHS) به وسیله‌ی آزمون RT-PCR انجام گرفت. طبق نتایج این پژوهش خاستگاه این بیماری ایجاد شده در مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان ایرانی، اروپا بوده است (۱). در پژوهش حاضر نیز همانند گزارشات قبلی تأیید بیماری با آزمون RT-PCR انجام شد و این آزمون به عنوان آزمایشی معتبر و آسان جهت تشخیص دقیق بیماری بسیار کارآمد است. با توجه به پژوهش‌های مختلف پیشین در بررسی این بیماری، خاستگاه آن را کشورهای اروپایی دانسته‌اند، بنابراین کنترل شدید و نظارت کامل بر واردات تخم چشم‌زده ماهی می‌تواند در روند کاهش چشم‌گیر بیماری در کشور و جلوگیری از شیوع و پراکنش در مزارع مختلف پرورش ماهی کمک نماید. در پژوهشی دیگر بیماری (VHS) در ۱۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، در دو تانک مجزا (شامل دو گروه کنترل و تیمار) مورد بررسی قرار گرفت. ۱۲، ۱۳ و ۱۴ روز پس از شروع آزمایش، ارگان‌هایی مانند کلیه، طحال، قلب، پوست، کبد، زوائد پیلوری و مغز ماهی‌های آلوده به عفونت بیماری و دارای علایم بیماری، جدا شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین بار ویروسی ارگان‌های مختلف وجود داشته است (۶). در پژوهش حاضر نیز همانند پژوهش (۶)، هفته اول پس از چالش بافت‌های آلوده به بیماری جداسازی شدند و همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بافت‌های ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی جهت تشخیص دقیق بیماری با تکنیک RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج بیماری در گروه‌های تزریق ویروس کاملاً مثبت ارزیابی شد.

محققان به منظور بررسی میزان ایجاد مقاومت در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و میزان بیان ژن Mx، دزهای مختلف واکسن DNA (۱۰ نانوگرم تا ۱۰ میکروگرم) را به صورت تزریق داخل عضلانی و داخل صفاقی در ماهیان با وزن ۱۰ تا ۱۰۰ گرمی انجام دادند. در مقایسه بین تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی، واکسیناسیون با تزریق داخل

www.SID.ir

Archive of SID

صفاقی میزان کمتری از مقاومت را نسبت به تزریق داخل عضلانی نشان داد (۱۱). در این تحقیق نیز شیوه ایجاد چالش به صورت تزریق داخل صفاقی انجام شد که نتیجه آن به صورت کاملاً موفقیت‌آمیز منجر به بروز بیماری در گروه‌های آزمایشی A و B شد و نتیجه بروز و شیوع بیماری جهت اطمینان کامل جهت ادامه مراحل پژوهش با تست RT-PCR اعتبار سنجی شده و مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱).

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر به منظور بررسی میزان تأثیر تزریق ویروس سپتی سمی هموراژیک بر صفات رشد و بیومتری حساس‌ترین گونه‌ی آبزی (قزل‌آلای رنگین کمان) و به صورت شدیدترین نوع چالش ممکن (تزریق مستقیم داخل صفاقی) انجام گرفت. نتایج در هفته اول و دوم بطور واضح تأثیر شدید ویروس را بر کاهش وزن ماهیان ناقل ویروس نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تزریق شده با سرم فیزیولوژی نشان دادند. همچنین عمدتاً تأثیر ویروس بر روی صفات طول بدن از روز هشتم به بعد نمایان شد بطوری‌که در انتهای روز چهاردهم بعد از تزریق، گروه‌های ناقل ویروس کمترین مقادیر مربوط رشد طولی را نشان دادند. در پژوهش حاضر که بر روی پنج گروه مختلف انجام شد برای کلیه صفات نمونه‌گیری تصادفی انجام شد و تعداد تکرار در هر گروه ۳۰ قطعه ماهی در نظر گرفته شد تا نتایج حاصله با قابلیت اعتماد بیشتری مورد توجه قرار گیرند. چنانچه در آینده پروژه‌های تحقیقاتی با انواع گونه‌های قزل آلا (رنگین‌کمان، قهوه ای و خال قرمز) انجام شود و میزان تلفات، رشد و پارامترهای بیومتری هر کدام کامل با تعداد نمونه‌های کافی مورد سنجش قرار گیرد و همچنین دو رگه‌های حاصل از تلاقی این گونه‌ها و میزان مقاومت آنان به بیماری دقیق بررسی شود می‌توان امیدوار بود با توجه به عدم وجود درمان قطعی برای بیماری VHS، مناسب‌ترین گونه‌ها جهت پرورش در صنعت قزل‌آلا بکار گرفته شوند. بررسی هر چه بیشتر بیماری در دیگر گونه‌های ماهی می‌تواند دانش محققان را جهت مقابله بیشتر و بهتر با بیماری فراهم آورد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان اذعان نمود آلودگی به ویروس سپتی سمی هموراژیک در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان می‌تواند اثر منفی بر پارامترهای اقتصادی از جمله وزن و رشد ماهی داشته باشد و این امر موجب ضرر و زیان اقتصادی زیادی برای پرورش‌دهندگان خواهد شد. لذا با تکرار این قبیل پژوهش‌ها و تأیید نتایج پژوهش حاضر و با انجام کارهای ترویجی می توان حساسیت تولیدکنندگان صنعتی در رعایت نکات بهداشتی و اقدامات پیشگیری در مزارع پرورشی را افزایش داده، تا بتوان زیان اقتصادی ناشی از بیماری را هر چه بهتر و بیشتر کاهش داد. در این راستا، نظارت دقیق، کامل و اصولی بر روند واردات تخم چشم زده از خارج کشور هم می‌تواند بر بهبود وضعیت سلامتی مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان بسیار مؤثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی کامل، شرکت فناوری‌های پیشرفته مبارک‌اندیش انجام شده است، لذا نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولان محترم این شرکت جهت تأمین بودجه انجام پروژه اعلام می‌دارند. همچنین از جناب آقای احسان امیری پرورش‌دهنده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در شهرستان الشتر جهت در اختیار قرار دادن ماهی برای پروژه مذکور بسیار قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1-Ahmadivand, S., M. Soltani, K. Mardani, S. Shokrpoor, H. Rahmati-Holasoo, H. Mokhtari and R. Hasanzadeh. 2016. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Iran. *Acta Tropica* 156: 30-36.

2-Brunson, R., K. True and J. Yancey. 1989. VHS virus isolated at Makah national fish hatchery. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter* 17: 3-4.

3-Carlander, K. D. 1969. Handbook of fresh water fishery biology. Iowa State University. Press; Ames, IA. 752P.

4-Castric, J and P. de Kinkelin. 1980. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout salmo gairdneri richardson reared in sea-water. *Journal of Fish Diseases* 3: 21-27.

5-Fattahi, F., Akhlaghi, M. Mohammadi, A. Soltanian, S and N. Shahbazian. 2019. Phylogenetic analysis of viral hemorrhagic septicemia virus from recent outbreaks in some of the Iranian farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 4:1-12.

6-Ghiasi, F and N. Jorgen Olesen. 2014. Detection of virus level in tissues of rainbow trout, Oncoryhinchus mykiss in clinical stage of viral hemorrhagic septicemia. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 7: 03-06.

7-Guðmundsdóttir, S., N. Vendramin, A. Cuenca, H. Sigurðardóttir, A. Kristmundsson T, Moesgaard Iburg and N. Jørgen Olesen. 2019. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (Cyclopterus lumpus) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *Journal of Fish Diseases* 42:47-62.

8-Haghighi Khiabanian, A., M. Bandehpour, Z. Sharifnia and B. Kazemi. 2008. Diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Iranian rainbow trout aquaculture by pathology and molecular techniques. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists* 28: 170-175.

9-Hill, B. 1992. Impact of viral diseases on salmonid fish in Europe. In: Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. Japan, Hokkaido University.

10-Maitland, P. S. 2000. Guide to freshwater fish of britain and europe. *Publishing group limitedoctopus, Essex*, 256 p.

11-McLauchlan, P. E., B. Collet, E. Ingerslev, C. Secombes, N. Lorenzen and A. Ellis. 2003. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of

www.SID.ir

Archive of SID

injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish and Shellfish Immunology* 15: 39-50.

12-Meyers, T. R., S. Short, K. Lipson, W. Batts, J.R. Winton, J. R. Wilcock and E. Brown. 1994. Association of viral hemorrhagic septicemia virus with epizootic hemorrhages of the skin in Pacific herring clupea harengus pallasi from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 19: 27-37.

13-Ogut, H and C. Altuntas. 2011. Virulence of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) genotype Ie on fry of three trout species: black sea trout (Salmo trutta labrax), rainbow trout (Oncohynchus mykiss) and brook trout (Salvelinus fontinalis). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 31: 132- 139.

14-Pujolar, J., M. Deleo, G. A. Ciccotti, E. and L. Zane. 2009. Genetic composition of atlantic and mediterranean recruits of European eel anguilla anguilla based on EST-linked microsatellite loci. *Journal of Fish Biology* 74: 2034-2046.

15-Skall, H., N. Olesen and S. Mellergaard. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review. *Journal of Fish Diseases* 28: 509-529.

16-Snow, M., N. Bain, J. Black, V. Taupin1, C. O. Cunningham, J. A. King ,H. F. Skall and R. S. Raynard. 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Diseases of aquatic organisms* 61: 11-21.

17-Walker, P. J., A. Benmansour, R. Dietzgen, R.X. Fang, A.O. Jackson, G. Kurath, J.C. Leong, S. Nadin-Davies, R.B. Tesh and N. Tordo .2000. (ED), Family Rhabdoviridae In: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, San Diego, CA 563:583.

18-Wolf, K. 1988. (ED), Viral hemorrhagic septicemia in fish viruses and fish viral diseases 217-249.

19-Yusuff, S., G. Kurath, M. Sun Kim, T. Tesfaye, J. Li, D. McKenney and V. Vakharia. 2019. The glycoprotein, non-virion protein, and polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus are not determinants of host-specific virulence in rainbow trout. *Virology Journal* 31: 16-31.

www.SID.ir