مقاله علمی–پژوهشی:

استفاده از روش Real-Time PCR به منظور شناسایی بیماری‌های ویروسی اخطار کردنی (IPN، VHS و IHN) در مولدین قزل‌آلای رنگین کمان نسل پایه ماهیان عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF)

سید جلیل ذریه زهرا[۱]، مهتاب یارمحمدی[*۲]، سید داود حسینی[۳]، محمد پورکاظمی[۱]، رضوان‌اله کاظمی[۲]، ابوالفضل سپهداری[۱]، محدث قاسمی[٤]، شاپور کاکولکی[۱]، محمدرضا مهرابی[۱]، علیرضا شناور ماسوله[۲]، مریم قیاسی[٥]

[*]mahtabyarmohammadi@gmail.com

۱- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲- مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه منطقه مرکزی (اراک)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
٤- پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران
٥- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

هدف از اجرای این پژوهش، شناسایی عوامل مختلف بیماری‌زا ویروسی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از روش Real-Time PCR به منظور تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های ویروسی شایع شامل بیماری نکروز عفونی بافت خونساز (IHN)، بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی (VHS) و بیماری نکروز عفونی پانکراتیک (IPN) در جمعیت مولدین نسل پایه نگهداری شده در طرح کلان ملی تولید ماهیان عاری از بیماری‌های خاص (SPF) بوده است. بدین منظور از مولدین مزارع منتخب مورد تایید سازمان دامپزشکی کشور در استان‌های مازندران، کهگیلویه و بویراحمد و آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری از ماهیان در رده‌های سنی متفاوت و از اندام‌های مختلف صورت پذیرفت و نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند. استخراج RNA و آزمایشات Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ویروس‌های مورد نظر انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش ماهیان سالم و مشکوک به بیماری‌های ویروسی به روش Real-Time PCR، وجود ویروس‌های بیماری‌زای VHS و IHN را در تعدادی از مزارع منتخب نشان داد در حالیکه ویروس بیماری‌زای IPN در نمونه‌ها شناسایی نشد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی بنظر می‌رسد که روش Real-Time PCR می‌تواند به عنوان روش تشخیصی سریع در آزمایش‌های غربال‌گری بیماری‌های ویروسی قزل‌آلای رنگین کمان و نیز روش مکمل تشخیص ویروس‌های بیماری‌زا در ادامه آزمایش‌های متداول کشت بافت مورد استفاده قرار گیرد.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، بیماری‌های ویروسی، Real-Time PCR، IPN، IHN، VHS

[*]**نویسنده مسئول**

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

مقدمه

تقاضای رو به رشد جهانی برای غذاهای دریایی همچنین ظرفیت محدود بخش صیادی برای برآوردن این تقاضا موجب شد، صنعت آبزی پروری در سراسر دنیا رشد یابد. استرس در محیط‌های پرورشی ممکن است توانایی مقابله با عفونت را در ماهیان تحت تأثیر قرار دهد و از سوی دیگر، شیوه‌های پرورش متراکم نیز موجب انتقال سریع بیماری می‌شوند. عوامل بیماری‌زای ویروسی چندین دهه است که سبب ایجاد بیماری‌های مهلک و چالش برانگیز در آبزیان شده است، زیرا درمان اساسی و واکسن‌های موثر ویروسی برای آنها در سیستم‌های آبزی‌پروری وجود ندارد (نفیسی، ۱۳۸۹). سه بیماری ویروسی نکروز عفونی بافت خونساز (IHN)[1]، سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی (VHS) [2]و نکروز عفونی پانکراتیک (IPN)[3] از جمله بیماری‌های ویروسی بشدت مسری در مزارع پرورشی دنیا به عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات در صنعت آبزی پروری آزاد ماهیان معرفی شده است (نفیسی، ۱۳۸۹). بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بیماری‌های واگیردام (OIE)[4] روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های مذکور شامل کشت سلولی، RT-PCR ، IFAT [5]، NT [6]، ELISA یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Real-Time پیشنهاد شده است (OIE, 2016).

شاید اولین گزارشی که در آن بتوان به شناسایی ردپای بیماری‌های ویروسی اخطار کردنی[7] در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در کشور اشاره نمود، گزارش ذریه‌زهرا و همکاران (۱۳۸۴) باشد. آنها در این مطالعه به بررسی علل احتمالی سندرم تلفات نوزادان و ماهیان جوان قزل آلای رنگین کمان در سطح شش استان مطرح در پرورش ماهیان سردآبی در کشور پرداختند و با روش‌های گوناگون تشخیصی همچون کشت سلول، میکروسکوپ الکترونی، ELISA، پادتن‌های درخشان (FAT)، هماتولوژی و آسیب‌شناسی و با استفاده از پادتن‌های اختصاصی پلی‌کلونال و منوکلونال، و بهره‌گیری از روش‌های مورد توصیه OIE، علاوه بر جداسازی یک نمونه رابدوویروس (IHN-like virus)، موفق شدند پادتن‌های مربوط به ویروس IHN، IPN و نیز VHS را در مولدین و بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان شناسایی و ردیابی نمایند (Zorriehzahra *et al*., 2005). در ادامه تحقیقات، نتایج آنان وجود پادتن و ردپای ویروس‌های هر سه بیماری اپی‌زئوتیک مذکور را در سرم خون مولدین ماهیان قزل آلای استان‌های مورد مطالعه، اثبات نمود (Zorriehzahra *et al*., 2019).

ویروس IHN، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت پرورش آزادماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین کمان است. تاکنون درمانی برای آن شناخته نشده است و تا ۱۰۰٪ تلفات ایجاد می‌کند (Dhar *et al*., 2008). عامل ایجاد این بیماری یک گونه ویروس از جنس *Norirhabdovirus* از خانواده Rhabdoviridae است که در گونه‌های متعددی از آزادماهیان وحشی و پرورشی ایجاد بیماری می‌نماید. ژنوم ویروس IHN بصورت تک‌رشته‌ای و شامل یک‌رشته غیرکد دهنده RNA با اندازه تقریبی ۱۱۰۱ کیلوباز است. در ژنوم ویروس IHN، شش ژن شامل: nucleocapsid (N)، Polymerase-assiciated phosphoprotein (P)، Virus polymerase (L) وجود دارد. در میان ژن‌های IHN، ژنN ابتدا بیان می‌شود و در طول بیماری ویروسی فراوان‌ترین است (Bootland and Leong, 2011). بنابراین، N-gene یک ژن خوب برای تشخیص اولیه بیماری IHN است. در مقایسه با ژن N، ژن G در فرآیند بیماری و دیرتر (حدود ۱۰-۹ ساعت بعد از بیمار شدن) بیان می‌شود که به همین علت از این ژن به عنوان یک نشانگر خوب جهت آنالیز فیلوژنی ایزوله‌های ویروس IHN استفاده می‌گردد (Troyer *et al*., 2000; Graver *et al*., 2003; Kurath *et al*., 2003). ژن L، ژن اولیه و محافظت شده در بین تمام سویه‌های ویروس IHN است. بعلاوه، این موضوع که همه توالی‌های ژن L که در پایگاه‌های اطلاعاتی ثبت شده‌اند، دارای توالی یکسانی می‌باشند، بدان معناست که پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن L قادر به تکثیر سویه‌های مختلف ویروس IHN می‌باشند (Dhar *et al*., 2008). این ویروس سبب مرگ و میر در بچه‌ماهیان می‌شود و از آنجاییکه این بیماری به هر دو روش افقی و عمودی قابل انتشار است، ماهیان بالغ آلوده به عنوان ناقل این ویروس باقی می‌مانند. این بیماری اولین بار از شمال غربی آمریکا در آبهایی با دمای زیر ۱۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده و در ایران احتمالاً در استان فارس و استان‌های مجاور گزارش شده است (ستاری و روستایی، ۱۳۷۸). در سال‌های اخیر نیز مواردی از وقوع و تلفات رسمی از

[1] Infectious Hematopoietic Necrosis
[2] Viral Hemorrhagic Septicemia
[3] Infectious Pancreatic Necrosis
[4] World Organization of Animal Health
[5] Immunofluorescent antibody test
[6] Neutralization test
[7] Notifiable

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

این بیماری در برخی استان‌های کشور گزارش شده است (Adel *et al*., 2016).

ویروس VHS، از بیماری‌های ویروسی مهلک در آزادماهیان (قزل‌آلا) است و یک ویروس تک‌رشته‌ایی متعلق به جنس *Novirhabdovirus*، از خانواده رابدوویروس (Rhabdoviridae) می‌باشد (Dietzgen and Kuzmin, 2012). ژنوم VHS شامل تقریبا ۱۱ کیلو باز و ۶ ژن کد کننده از جمله Nucleocapsid-(N)، فسفو-(P)، ماتریکس(M)، گلیکو (G)، غیرساختاری (NV) و پروتئین RNA پلیمراز (L) است. بر اساس آنالیز فیلوژنی ژن‌های پروتئین N، P، G و NV، ایزوله‌های ویروس VHS به ۴ ژنوتایپ متفاوت شامل ژنوتایپ‌های I، II، III و IV تقسیم بندی می‌شوند (Snow *et al*., 2004; Einer-Jensen *et al*., 2005). این بیماری سبب تلفات بالا در مزارع پرورش قزل‌آلا می‌شود و برای اولین بار در سال ۱۳۸۳ در کشور گزارش گردید (Haghighi *et al*.,2008). به طور رسمی سازمان دامپزشکی کشور این بیماری را در سال ۱۳۸۵ به سازمان جهانی بیماری‌های واگیر دام (OIE) گزارش نمود. در سال ۱۳۹۲ وقوع همه گیری‌های شدید از این بیماری در استان‌های مختلف کشور گزارش شد که موجب خسارات اقتصادی بسیار در میان مزارع سردآبی کشور گردید (بکایی و همکاران، ۱۳۹۶).

ویروسIPN، در آزادماهیان سبب تلفات شدیدی در بچه ماهیان با سن زیر ۶ ماه و نیز ماهیان بالغ می‌گردد. عامل ایجاد این بیماری یک ویروس ۲ رشته‌ای بدون پوشش از خانواده Birnaviridae، جنس *Aquabirnavirus*، دارای قطر تقریبی ۶۰ نانومتر می‌باشد. ژنوم این ویروس دارای ۲ قطعه RNA دو رشته‌ایی است. قطعه A، که پروتئین ویروسی کپسید را کد می‌کند (VP2)، پروتئین داخلی (VP3)، یک پروتئاز ویروسی (VP4)، و یک پروتئین غیرساختاری (VP5) و قطعه B که RNA پلیمراز را کدگذاری می‌کند (Dobos, 1995). مولدین ناقل دارای سطوح متفاوت بیماری‌زایی در مواد تناسلی تخمک و اسپرم می‌باشد بطوریکه انتقال عمودی این ویروس بر خلاف ضدعفونی گسترده در سطح تخم ها مشاهده شده است. جهت جلوگیری از انتقال عمودی ویروس IPN، مواد تناسلی مولدین مشکوک به بیماری مورد آزمایش قرار می‌گیرد. از آنجایی‌که تعداد ویروس IPN در بافت‌های آلوده به ویروس پایین است، استفاده از روش‌های حساس کاربردی مورد نیاز است (Tapia *et al*., 2017). بعلاوه، شناسایی IPN باید بر اساس روش‌های مناسب تشخیصی جهت شناسایی سروتیپ های مختلف ویروس باشد.

در حال حاضر، استفاده از روش Real-time PCR جهت تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های ویروسی آبزیان به طور گسترده‌ای مورد استقبال قرار گرفته است (Bowers *et al*., 2008; Ørpetveit *et al*., 2010; Bowers and Dhar, 2011; Eissler *et al*., 2011) . در ایران، با توجه به شرایط و امکانات آزمایشگاهی از روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های قزل‌آلای رنگین کمان استفاده می‌شود. با توجه به اطلاعات موجود و گزارش سه ویروس IHN، VHS و IPN به عنوان عوامل بیماری‌زا در کشور، نیاز به دسترسی به اطلاعات در مورد روش‌های تشخیصی سریع و دقیق، پراکنش ویروس و انواع گروه‌های ژنی[1] موجود در کشور وجود دارد. به طور متداول، روش پیشنهادی برای تشخیص بیماری‌های ویروسی در کشور، جداسازی و کشت سلولی ویروس و متعاقب آن شناسایی ویروس با استفاده از روش ELISA و آنتی بادی ویروس و نیز استفاده از روش RT-PCR است. روش‌های مورد استفاده به رغم دقت بالا، بسیار وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشند و علاوه بر آن نیاز به آزمایشگاه‌های تخصصی می‌باشد. به رغم گسترش استفاده از روش‌های کمی مبتنی بر PCR از جمله Real-Time PCR در بسیاری از کشورها، با این وجود این روش در ایران هنوز متداول نشده است. در این پژوهش با استفاده از روش Quantitative Real-Time PCR، شناسایی و تشخیص سه بیماری اساسی و مهم ویروسی قزل‌آلای پرورشی شامل IPN، IHN و VHS صورت گرفت که در ایران علت عمده مرگ و میر ماهیان قزل‌آلای پرورشی در سال‌های اخیر بشمار می‌روند و در چندین کارگاه در استان‌های کهکیلویه و بویراحمد، آذربایجان غربی و مازندران در راستای اجرای طرح کلان ملی تولید ماهیان عاری از بیماری خاص (SPF) مورد بررسی قرار گرفت و از آنجایی که یک روش تشخیصی سریع و دقیق در شناسایی بیماری‌های ویروسی می‌باشد، استفاده از روش Real-Time PCR کمک بسیار مهمی در کنترل و پیشگیری از بیماری‌های ویروسی قزل‌آلای رنگین کمان در کشور خواهد نمود.

[1] Genogroups

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

با مراجعه به مزارع منتخب در استان‌های مازندران، کهگیلویه و بویر احمد و آذربایجان غربی از زمستان ۱۳۹۴ لغایت تابستان ۱۳۹۵ علایم بالینی بیماری‌های ویروسی شامل تیرگی رنگ، خونریزی‌های جلدی و داخلی، عدم تعادل در شنا، بی‌اشتهایی، بی‌حالی، گوشه‌گیری و مرگ مورد توجه قرار گرفت. ماهیان دارای علایم بالینی و کالبدگشایی به صورت جداگانه نمونه‌برداری شدند. جمعاً ۲۲ نمونه تجمیع شده (Pool) از بافت‌های کلیه، طحال و آبشش یا از مایعات تناسلی از حداکثر ۱۰ عدد ماهی در یک ویال فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل (شامل ۱۴ نمونه مایع تناسلی و ۸ نمونه تجمیع شده از بافت های مختلف) جمع‌آوری و پس از شماره‌گذاری به داخل تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه ویروس شناسی پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی (انزلی) به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. همچنین از سه نمونه ویروس جدا شده موجود در مرکز انزلی بعنوان نمونه‌های کنترل مثبت و نیز ۱۲ نمونه کشت سلولی برای ویروس‌های مورد مطالعه استفاده گردید.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های بافت و مایع کشت سلولی با استفاده از کیت SinaPure Kit (RNA Extraction Kit) و براساس دستورالعمل مربوطه انجام پذیرفت. نمونه‌های استخراج شده ابتدا با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND1000, USA) تعیین غلظت شدند و پس از رقیق‌سازی با غلظت یکسان (500 ng/µl)، نسبت به ساخت cDNA اقدام گردید (Bowers *et al*., 2008). بمنظور حذف هرگونه باقی مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، مقدار ۱۰ میکروگرم از RNA کل برای هر نمونه با استفاده از *DNase- RNase* free (Fermentas, France) تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) انجام شد.

طراحی آغازگرهای Real-Time

توالی آغازگرهای Real-Time PCR برای ۳ ویروس بر اساس منابع موجود تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی بیماری‌های ویروسی قزل‌آلای رنگین کمان

Table 1: Sequence of primers used in the identification of rainbow trout viral diseases

پرایمر	توالی	منبع
Rainbow trout –beta actin 1301F	CCCAAACCCA GCTTCTCAGT CT	Dhar *et al*., 2008
Rainbow trout –beta actin 1413R	TGCTTCACCG TTCCAGTTGT G	
Rainbow trout EF-136F	TGATCTACAA GTGCGGAGGC A	
Rainbow trout EF-236R	CAGCACCCAG GCATACTTGA A	
IPN-WB1-qRT2	CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	Tapia 2017
IPN-WB2-qRT2	CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG	
IPN-VP2F-qRT3	TCCAACTACGAGCTGATCCC A	
IPN-VP2R-qRT3	GTCCTCTCCTTGTACTCCTC	
VHS OIE-1F	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC3	OIE, 2016
VHS OIE-1R	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA3	
VHS OIE-2F	ATGAGGCAGGTGTCGGAGG	
VHS OIE-2R	TGTAGTAGGACTCTCCCAGCATCC	
IHN-N316F	ACCTTCGCAGATCCCAACAAC	Dhar *et al*., 2008
IHN-N441R	TGTGGCCATCTTGTCCACATC	
IHN-G296F	TCCACAAAGTCCTGTACCGCA	
IHN-G409R	TGTCATACGCCCCTGCTTCTT	
IHN-N737F	TGTGCATGAAGTCAGTGGTGG	
IHN-N843R	CCTGCTCATCATGACACCGTA	
IHN-G1035F	CGCTATGCACAAAGGCTCCAT	
IHN-G1147R	ATTTCGTGAAGCTGGTAGCGC	

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

آزمایش Real Time PCR

واکنش‌های qPCR در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر و با استفاده از 1 × SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen) و دستگاه BioRad, CFX96 و نرم افزار Bio-Rad, USA) Opticon Monitor 3.0) انجام شد. هر واکنش برای هر آغازگر با غلظت نهایی ۰/۲ میکرو مولار، سایبر گرین ۱x و رنگ رفرنس ROX و در ۳ تکرار انجام گردید. به منظور تعین دمای مناسب اتصال پرایمر [1] و تکثیر هر آغازگر، و با استفاده دو نمونهcDNA مربوط به ویروس استاندارد (نمونه کنترل مثبت) تست گرادیان (۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد) و با ارزیابی کیفیت منحنی تکثیر و نیز منحنی نقطه ذوب (melt curve) در دستگاه Real-Time PCR محاسبه و مشخص گردید. به منظور اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در تهیه مسترمیکس PCR، یک واکنش کنترل بدون نمونه الگو در هر پلیت قرار گرفت. آغازگر ژن‌های مرجع داخلی از جمله β-actin و elongation factor 1-α (EF-1-α)، بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن (شماره دسترسی بترتیب: AF157514 و AF498320) مورد استفاده قرار گرفتند (Dhar *et al*., 2008).

بهینه سازی شرایط تکثیر هر جفت آغازگر از طریق رسم منحنی استاندارد

به منظور ارزیابی تکرارپذیری آزمایش و نیز تخمین کارایی (E) آغازگرهای مورد استفاده، منحنی استاندارد برای هر جفت آغازگر با استفاده از تکثیر هر جفت آغازگر برای نمونه cDNA ویروس و در سه تکرار در هر پلیت بکار رفت. تکرارپذیری با مقدار R^2 در منحنی استاندارد مشخص گردید. راندمان تکثیر (E)، از فرمول E= 10 (-1/slope) و با استفاده از شیب منحنی استاندارد محاسبه شد. راندمان تکثیر (E) معمولاً به درصد بیان می‌شود، برای تبدیل E به درصد از فرمول: % Efficiency= 100×(E-1) استفاده شد. جهت ترسیم منحنی استاندارد و بدست آوردن کارایی تکثیر (PCR Efficiency) برای هر جفت آغازگر، ابتدا از cDNA های شاهد که از مرکز OIE برای دو ویروس VHS و IHN تهیه شده بود، سری‌های رقت با نسبت های ۱، ۱:۵، ۱:۲۵و ۱:۱۲۵ تهیه گردید. واکنش تکثیر کمی (qPCR) با استفاده از cDNA های سری رقت و کیت سایبرگرین (Bioer, China)، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید.

انجام واکنش یک مرحله‌ایی Real-time PCR

با توجه به حساسیت تشخیص، واکنش یک مرحله‌ای Real Time PCR با استفاده از کیت Quanti Nova SYBR Green RT-PCR Kit ساخت شرکت Qia-Gen کشور آلمان، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای مناسب اتصال پرایمر) و مطابق دستوالعمل کیت بر RNA کل نمونه‌ها انجام گرفت.

آنالیز داده‌ها

داده‌های نمونه‌ها با استفاده SYBR Green real-time RT-PCR از دستگاه CFX-96 Bio-Rad و نرم افزار BioRad CFXManager، استخراج گردید. چرخه آستانه ۲ (ct)، تعداد چرخه‌هایی است که در آن میزان نور فلورسنت واکنش تکثیر برای اولین بارنسبت به زمینه از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. مقدار ct با میزان استفاده از ویروس نسبت معکوس دارد. بنابراین، هر چه میزان ct پایین تر باشد، نشانگر تعداد بیشتر ویروس است. آغازگرهای β-actin و elongation factor 1-α (EF-1-α) مربوط به قزل‌آلای رنگین کمان برای آزمایش‌های Real-time PCR به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. مقادیر ct به صفحه گسترده Excel به منظور آنالیز داده‌ها منتقل شد.

نتایج

نتایج کیفی RNA استخراج شده از بافت اندام‌های داخلی قزل‌آلای رنگین کمان در هر نمونه با استفاده از محلول BIOZOl، دو باند مجزا 18S و 28SrRNA که بیانگر کیفیت نمونه‌ها و کارایی روش مورد استفاده به منظور استخراج RNA از نمونه‌های آزمایشی بود، نشان داد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱- ۱/۸ قرار داشت که بیانگر کمیت قابل قبول RNA در نمونه‌های مختلف بود. همچنین به منظور ارزیابی کیفیت cDNA ساخته شده در نمونه‌های آزمایشی، از ژن‌های مرجع در قزل‌آلای رنگین کمان شامل ژن‌های β-actin و elongation factor 1-α (EF-1-α)، بر اساس توالی‌های

[1] Annealing

[2] Threshold cycle

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

موجود در بانک ژن (شماره دسترسی بترتیب: AF157514 و AF498320) استفاده گردید.

راندمان واکنش Real-time PCR

راندمان واکنش (E)[1] ژن کنترل داخلی و ژن‌های هدف با رسم منحنی استاندارد بر پایه مقادیر مشخص از cDNA در رقت‌های مختلف لگاریتمی تعیین شد. برای همه منحنی‌های استاندارد، ضریب همبستگی (R^2)≤۱۰۰ درصد) محاسبه شد. در کنترل‌های منفی واکنش که شامل نمونه‌های فاقدcDNA و نمونه‌هایcDNA فاقد آنزیمReverse transcriptase بود، هیچ سیگنالی مشاهده نشد، عدم مشاهده سیگنال در نمونه‌های cDNAفاقد آنزیم Reverse transcriptase نشان‌دهنده فقدان آلودگی DNA و در نمونه‌های فاقد cDNA نشان‌دهنده عدم آلودگی خارجی در حین انجام آزمایش بود. میزان راندمان واکنش PCR برای ژن‌های رفرنس و هدف به شرح ذیل بود.

منحنی استاندارد در آغازگرβ-actin دارای مقدار R2 (شاخص تکرارپذیری) ۰/۹۹۹ (R2=0.999) و شیب خط ۳/۵۹ – بود. نتایج تکثیر cDNA نمونه‌های آزمایشی با ژن‌های مرجع نشان داد که نمونه‌های آزمایشی از کیفیت خوبی برخوردار بودند و دمای ذوب آغازگر در مورد آغازگر β-actin، ۷۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید.

همچنین نتایج تکثیر cDNA نمونه‌های آزمایشی با استفاده از آغازگر ژن رفرنسEF-1-α نیز نتایج مثبتی که مبتنی بر کیفیت مناسب نمونه‌های آزمایشی بود را مشخص نمود. و دمای ذوب آغازگر در مورد آغازگرEF-1-α ، دمای ۷۸/۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید.

ارزیابی روش Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین در سه بیماری IPN,IHN,VHS

رقت‌های سریالی با نسبت ۱:۱۰ از cDNA ویروس‌های IPN,IHN,VHS تهیه و برای هر رقت با استفاده از ۲ جفت آغازگر در سه تکرار واکنش Real-Time PCR انجام شد. یک ارتباط خطی مناسبی بین مقدار cDNA مورد استفاده در واکنش (غلظت cDNA) و مقادیر Ct برای هر دو ژن مورد استفاده مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده از منحنی استاندارد در سه بیماری مورد مطالعه، بیماری ویروس VHS دارای شاخص تکرارپذیری(R^2) ۰/۹۷۵ و شیب خط ۲/۷۰۶ – ، بیماری ویروس IHN دارای شاخص تکرارپذیری (R^2) ۰/۹۷۱ و ۰/۹۴۸ و شیب خط ۳/۱۶ – و ۳/۲۲- و بیماری ویروس IPN دارای شاخص تکرارپذیری (R^2) ۰/۹۶۷ و ۰/۹۵۷ و شیب خط ۳/۲۸۴ – و ۳/۳۳۷- بود. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص شد، حداقل رقت (۰/۱) در cDNA، برای شناسایی ویروس مورد نیاز است.

آزمایش‌های Real-Time PCR یک مرحله‌ای

پس از بهینه نمودن آغازگرهای مورد نظر با استفاده از نمونه‌های مثبت بیماری در هر سه ویروس مورد مطالعه، به دلیل دقت بالای واکنش‌های تک مرحله‌ایی و عدم دستکاری و تخریب RNA تخلیص شده، از کیت سایبرگرین تک مرحله‌ای Real-Time PCR ساخت شرکت Qia-Gen کشور آلمان استفاده گردید. نتایج آزمایش‌های RT-qPCR وجود بیماری‌های VHS و IHN را در نمونه ماهیان مزارع پرورشی ذیل مثبت نشان داد. نتایج بررسی بیماری ویروسی VHS در نمونه‌های آزمایشی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مزارع مختلف پرورشی با استفاده از آزمایش Real-Time یک مرحله‌ای کیت Quanti Nova SYBR Green (Qia-Gen Germany) مشخص نمود که نمونه‌های مربوط به کارگاه‌های تکثیر و پرورش منتخب استان‌های مازندران، کهکیلویه و بویر احمد و آذربایجان غربی آلوده به ویروس VHS می‌باشند (شکل ۱).

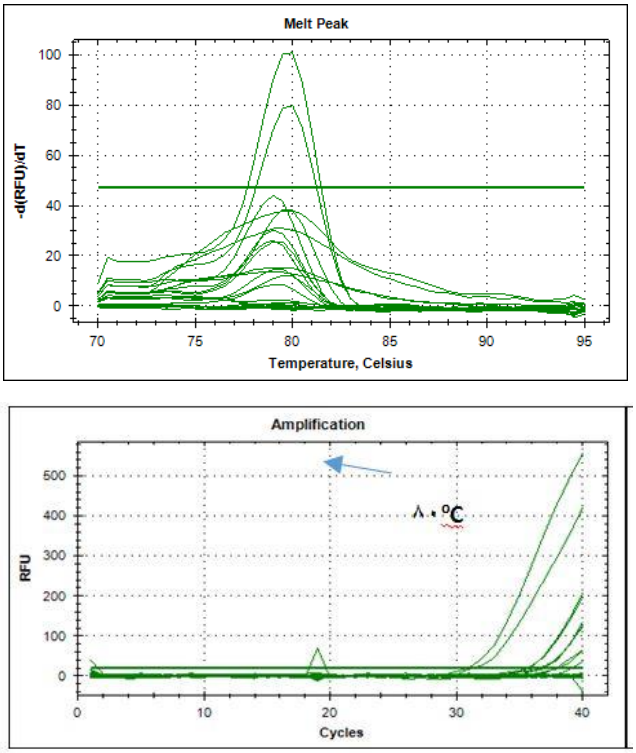
نتیجه تکثیر Real-Time PCR در نمونه‌های فوق با استفاده از آغازگر انتخاب شده برای ویروس IPN، تکثیری نداشت و بنظر می‌رسد که این بیماری در مزارع منتخب وجود نداشت. همچنین تکثیر نمونه‌های آزمایشی از مزارع منتخب پرورش قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از آغازگر بیماری ویروسی IHN، وجود ویروس بیماری‌زا را در برخی از نمونه‌های آزمایشی از مزارع استان‌های مازندران و آذربایجان غربی تایید نمود (شکل ۲).

بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های Real-time PCR در دو بیماری ویروسی IHN و VHS با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، دمای ذوب آغازگر در آغازگر بیماری ویروسیVHS، ۸۰ درجه سانتی‌گراد و در در بیماری ویروسی IHN، ۷۹/۵ درجه سانتی گراد تعیین گردید (شکل ۳).

[1] Efficiency

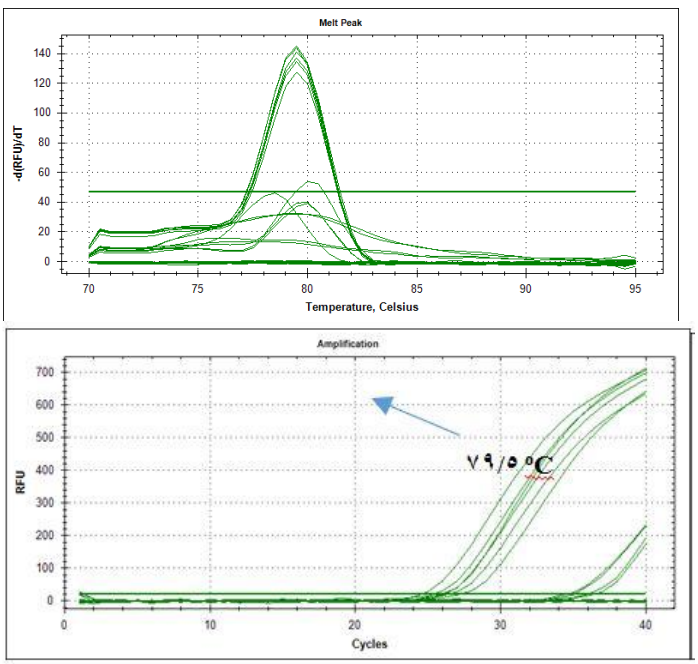
[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]



شکل ۱: نتایج تکثیر نمونه‌های RNA تخلیص شده از ماهیان مزارع مختلف با استفاده ازآغازگر بیماری ویروسی VHS و کیت Quanti Nova SYBR Green

Figure 1: Results of amplification of RNA samples purified from fish from different farms using VHS Viral Disease primers and Quanti Nova SYBR Green Kit

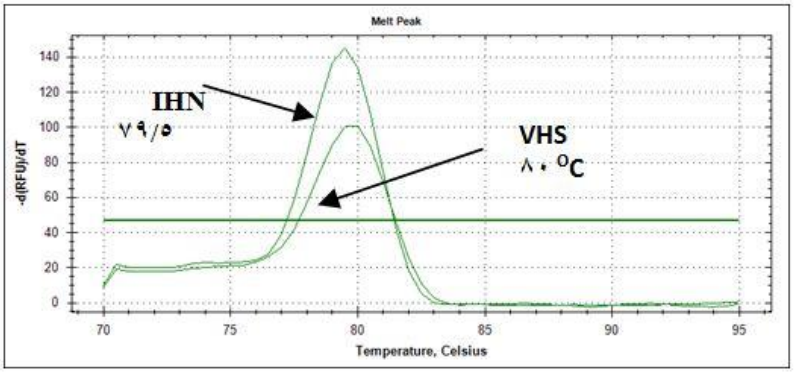


شکل ۲: نتایج تکثیر نمونه‌های RNA تخلیص شده از ماهیان مزارع مختلف با استفاده از کیت Quanti Nova SYBR Green

Figure 2: Results of amplification of RNA samples purified from fish in different farms using Quanti Nova SYBR Green Kit

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]



شکل ۳: نتایج منحنی نقطه ذوب آغازگرهای VHS و IHN در نمونه های آزمایشی ماهیان مزارع مختلف با استفاده از کیت Quanti Nova SYBR Green

Figure 3: Melting point curve results of VHS and IHN primers in experimental samples of fish in different farms using Quanti Nova SYBR Green Kit

بحث

روش‌های تشخیص مولکولی امکان شناسایی زودهنگام و جلوگیری از انتشار عوامل بیماری‌زای مهم را فراهم نموده است که این امر در نتیجه سرعت، حساسیت و دقت بالای آزمایش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد (Park *et al.*, 2011). آزمایشگاه‌های تشخیص بیماری‌های ویروسی، وابسته به استفاده از روش‌های تشخیص سریع، حساس و دقیق با قابلیت کاربری آسان و هزینه اقتصادی می‌باشند (Pierce *et al.*, 2013). آزمون استاندارد غربالگری در مورد رابدوویروس‌ها و بیرناویروس‌ها در آبزیان، کشت سلولی بوده که متعاقب آن از روش‌های سرمی مانند FAT یا مولکولی مانند PCR استفاده می‌شود (OIE, 2016). روش استفاده از کشت سلولی، روش مورد تایید سازمان جهانی بیماری‌های واگیردار می‌باشد که بهینه‌سازی آزمایشگاهی این روش نزدیک به ۱ ماه بطول می‌انجامد و در بعضی موارد نتیجه نادرست می‌دهد (Chico *et al.*, 2006; Lopez-Vazquez *et al.*, 2006, 2015; Jonstrup *et al.*, 2011). در مقایسه با روش‌های سنتی کشت سلولی، همه روش‌های مبتنی بر آزمایش‌های PCR، دارای توانایی بالایی در تشخیص بیماری‌های ویروسی می‌باشند (Hope *et al.*, 2010). انجام کشت سلولی و جداسازی ویروس‌های آبزیان در کشور به شکل بسیار محدود در مراکز تشخیص سازمان دامپزشکی و آزمایشگاههای تحقیقاتی کشور انجام می‌گیرد. بکارگیری آزمون یا آزمون‌هایی مناسب که سرعت عمل بالا و حساسیت مورد قبولی داشته باشند، بسیار ضروری بنظر می‌رسد.

روش‌های مولکولی به دلیل حساسیت بالا و سرعت عمل بمراتب از روش کشت سلولی کاربردی‌تر بنظر می‌رسد، هنگامی‌که تعداد زیادی نمونه تحت آزمایش قرار می‌گیرند یا در مورد آلودگی توأمان، روش‌های مولکولی از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به کشت سلولی برخوردار می‌شوند. تنها عیب روش‌های مولکولی هزینه بالای انجام آنهاست که حساسیت و سرعت عمل این جنبه منفی را می‌پوشاند. در صورتیکه استفاده از روش‌های مولکولی مورد تایید قرار بگیرد، هزینه انجام آن در گروه‌های ۱۵-۱۰ تایی کاهش خواهد یافت. با این وجود به دلیل عدم قطعیت کامل در استفاده از روش‌های مولکولی، استفاده از کشت سلولی هنوز هم به عنوان آزمون طلایی در تشخیص بیماری‌های ویروسی مورد تایید سازمان جهانی بیماری های واگیردام (OIE) می‌باشد.

پیشرفت‌های اخیر در شناسایی بیماری‌های عفونی در انسان، گیاه و گونه های کشاورزی بتدریج در مدیریت بهداشتی گونه‌های مهم آبزیان مورد استفاده قرار گرفت. برای مثال، استفاده از روش Real-time PCR در مطالعات بیان ژن و شناسایی بیماری‌های ویروسی در ماهیان و سخت پوستان را می‌توان عنوان نمود (Bowers *et al.*, 2008). روش Real-time PCR در سال ۱۹۹۲ ابداع شد (Higuchi *et al.*, 1993) و بسرعت به عنوان ابزاری کاربردی جهت مطالعات بیان ژن و سپس تشخیص بیماری بکار برده شد (Bustin, 2000; Niesters, 2000; Mackay *et al.*, 2002). سادگی، حساسیت، دامنه وسیع تشخیصی، تکرار پذیری و بازده بالا سبب شده که روش Real-time PCR روشی مورد توجه در شناسایی ویروس در نظر گرفته شود. در حال حاضر، رنگ‌های

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

فلورسنت متعددی جهت تشخیص محصول Real-time PCR در دسترس قرار دارد. این مواد شامل رنگ سایبر گرین متصل شونده به DNA غیراختصاصی، الیگوپروب‌های خطی نشاندار شده با فلورسنت، الیگو پروب‌های نوکلئاز-۵'، و بیکون‌های مولکولی می‌باشد (Mackay *et al*., 2002). در بین رنگ‌های فلورسنت، سایبرگرین روش ساده و کم هزینه‌تری می‌باشد و نیاز به طراحی الیگوپروب‌های نشاندار ندارد. همچنین اختصاصی بودن محصول تکثیر شده نیز با بررسی نمودار نقطه ذوب[1] محصول تکثیر شده قابل تشخیص است (Ririe and Rasmussen, 1997). در مطالعات متعددی از روش Real-time PCR با استفاده از سایبرگرین-I برای تشخیص بیماریهای ویروسی استفاده شده است (Dhar *et al*., 2002, 2008; Ørpetveit *et al*., 2010) بطوریکه روش‌های ارائه شده دارای قابلیت استفاده به عنوان ابزار کاربردی در مدیریت بیماری‌های ویروسی در هچری‌های تجاری می‌باشد (Knusel *et al*., 2007; Eissler *et al*., 2011).

در این تحقیق همزمان با سایر روش‌های تشخیص بیماری‌های ویروسی در قزل‌آلای رنگین کمان، از روش Real-Time PCR به منظور بررسی بیماری‌های ویروسی در نمونه بافت اندام‌های داخلی قزل‌آلای رنگین کمان مزارع مختلف پرورشی استفاده گردید. نتایج تحقیق به منظور تشخیص بیماری ویروسی VHS در نمونه‌های آزمایشی (متعلق به مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان) به همراه نمونه‌های مثبت بیماری ویروسی VHS، نشان داد که نمونه‌های آزمایشی در برخی از نمونه‌های مزارع منتخب دارای بیماری مذکور بودند. نتایج حاصل از آزمایش‌های متعدد با استفاده از مواد شیمیایی از جمله محلول BIOZOL و همچنین کیت‌های استخراج RNA ویروسی و RNA کل، نشان داد که روش استخراج با استفاده از موارد آزمایشی تاثیر چندانی در نتیجه آزمایش ندارد بلکه مواد مصرفی یا کیت مورد استفاده در بررسی‌های انجام شده با Real-Time PCR، به دلیل حساس بودن RNA تخلیص شده ویروس می‌تواند نقش موثری در تشخیص و شناسایی ویروس داشته باشد. همچنین در موارد آزمایشی با استفاده از RNA تخلیص شده از بافت‌های هدف و همچنین محیط کشت سلولی، نتایج یکسانی بدست آمد. نتایج بدست آمده همزمان با نمونه‌های مثبت ویروس مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج گزارش Chico و همکاران (۲۰۰۶) مبنی بر کاربرد روش Real-time PCR در در تشخیص بیماری ویروسی VHS در قزل‌آلای رنگین کمان مطابقت داشت. در مطالعه Pierce و همکاران (۲۰۱۳) در زمینه تشخیص و شناسایی بیماری ویروس VHS در ماهیان در Great Lakes با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس منطقه حفاظت شده در همه سویه‌ها، شناسایی ویروس VHS به صورت اختصاصی امکانپذیر گردید. در این روش استفاده از آغازگرهای ژن رفرنس، تشخیص مناسب و نیز نرمال سازی کمیت مولکول‌های ویروس را فراهم آورد که با نتایج پژوهش حاضر مبنی بر بررسی کیفیت cDNA های نمونه‌های آزمایشی با استفاده از آغازگر ژن‌های رفرنس مطابقت داشت. همچنین بر اساس دستورالعمل منتشره از سازمان OIE (۲۰۱۶) استفاده از روش یک مرحله‌ای Real-time PCR را جهت شناسایی ویروس VHS پیشنهاد نموده است که نتایج تحقیقات حاضر کارایی استفاده کیت‌های تک مرحله‌ای را تایید نمود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آغازگرهای طراحی شده جهت تشخیص بیماری ویروسی IHN، دارای قابلیت تشخیص این ویروس در نمونه‌های مثبت بیماری می‌باشند. بر اساس اطلاعات بدست آمده در این پژوهش، بنظر می‌رسد که روش Real-time PCR تک مرحله‌ای با استفاده از سایبرگرین، روشی سریع و کاربردی جهت تشخیص بیماری ویروسی IHN در قزل آلای رنگین کمان باشد. در دستورالعمل OIE (۲۰۱۶) استفاده از روش تکثیر نسخه‌بردار معکوس[2] و PCR استاندارد به عنوان روش تکمیلی متعاقب کشت بافت پیشنهاد شده است. مطالعات متعددی استفاده از روش Real-time PCR را به عنوان روش تشخیصی سریع پیشنهاد نموده‌اند. نتایج تحقیقات انجام شده Dhar و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن‌های N و G در ویروس IHN با استفاده از روش سایبرگرین، دارای قابلیت شناسایی این ویروس می‌باشند(Dhar *et al*., 2008). در مطالعه حاضر از بافت‌های اندام‌های داخلی از جمله کلیه، طحال، آبشش و مایعات تناسلی جهت استخراج RNA کل و تشخیص و شناسایی ویروس در نمونه‌های آزمایشی در مزارع منتخب قزل‌آلای رنگین کمان استفاده گردید. نتایج نشان داد روش استخراج و نوع بافت دارای تاثیر یکسانی در تشخیص ویروس بیماری‌زا می‌باشد. حال آنکه اختلاف در نتایج بدست آمده به روش تشخیص ویروس با استفاده از روش Real-Time PCR بستگی دارد. در

[1] Melt curve

[2] Reverse Transcriptase

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

بررسی‌های انجام شده بر نمونه‌های مربوط به مزارع پرورشی منتخب و استفاده از روش‌های مختلف آزمایشگاهی، نمونه مثبت بیماری IPN مشاهده نگردید. این امر می‌تواند به دلیل عدم بیماری و گسترش آن در بین مزارع منتخب باشد یا اینکه روش مورد استفاده از جمله آغازگرهای مورد استفاده، دارای حساسیت لازم جهت شناسایی ویروس IPN نبود.

در تحقیق حاضر از نمونه‌های بافت و کشت سلولی بطور همزمان و مقایسه‌ای استفاده گردید. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نمونه‌های مثبت بیماری‌های ویروسی VHS و IHN همزمان در نمونه‌های محیط کشت سلولی و بافت‌های هدف قابل تشخیص بودند. بنظر می‌رسد با توجه به طولانی بودن مراحل طولانی کشت سلولی و نیاز به آزمایش‌های تکمیلی جهت تایید آن، در موارد غربالگری و تشخیص سریع بیماری‌های ویروسی، از روش استخراج RNA کل بافت و متعاقب آن آزمایش یک مرحله‌ای Real-Time PCR بتوان استفاده نمود. همچنین شایسته است به دلیل حساسیت بالای روش‌های تشخیصی و جلوگیری از بروز اشتباهات جبران ناپذیر، از روش تک مرحله‌ای Real-Time PCR به جای روش‌های دو مرحله‌ای استفاده شود و رهیافت آخر آنکه با توجه به اهمیت مطالعات همه‌گیرشناسی، این روش می‌تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی سریع و مطمئن در برنامه‌های جامع پایش و مراقبت[1] سازمان های اجرائی کشور در جهت کنترل، پیشگیری و ریشه کنی بیماری‌های ویروسی اخطارکردنی مذکور بکار رود.

منابع

بکایی، س.، آبسالان فرد، ک.، فلاح مهرآبادی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، قاجاری، ا. و شهبازیان، ن.، ۱۳۹۶. بررسی طغیان‌های سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی (Viral Hemorrhagic Septicemia) و عوامل مؤثر بر آن در مزرعه‌های ماهی قزل‌آلای کشور در سال ۱۳۹۳: یک مطالعه مقطعی. مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران. دوره ۱۳. شماره ۳. ۲۵۳-۲۶۱.

ذریه زهرا، ج.، سلطانی، م.، سیدی، ع. و مهرابی، م.، ۱۳۸۴. بررسی مقدماتی امکان ردیابی علل عفونی (ویروسی، باکتریایی) سندروم تلفات نوزادان و ماهیان جوان قزل آلای رنگین کمان پرورشی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. گزارش نهایی شماره ۸۴/۴۷۰. ۲۹۱ ص.

ستاری، م. و روستایی، م.، ۱۳۷۸. بهداشت ماهی ۱. انتشارات دانشگاه گیلان. ۲۸۴ ص.

نفیسی بهابادی، م.، ۱۳۸۹. راهنمای عملی پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان. انتشارات دانشگاه هرمزگان. ۳۶۵ ص.

Adel, M., Amiri, A.B., Dadar, M., Breyta, R., Kurath, G., Laktarashi, B. and Ghajari, A., 2016. Phylogenetic relationships of Iranian infectious hematopoietic necrosis virus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on the glycoprotein gene. *Archives of Virology*, 161(3), 657-663. DOI.org/10.1007/s00705-015-2684-8

Bootland, L.M. and Leong, J.C., 2011. Infectious haematopoietic necrosis virus. *Fish Diseases and Disorders*, 3, 66-109.

Bowers, R.M., Lapatra, S.E. and Dhar, A.K., 2008. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 226-234. DOI:10.1016/j.jviromet.2007.09.003

Bowers, R.M., and Dhar, A.K., 2011. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 25(1), 60-64. DOI:10.1016/j.mcp.2010.12.002

Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193. Doi:10.1677/jme.0.0250169

Chico, V., Gomez, N., Estepa, A. and Perez, L., 2006. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR.

[1] Monitoring and Surveillance

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

Journal of Virological Methods, 132(1-2), 154-159. DOI:10.1016/j.jviromet.2005.10.005

Dhar, A.K., Bowers, R.M., Licon, K.S. and LaPatra, S.E., 2008. Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by SYBR Green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 147(1), 157-166. DOI:10.1016/j.jviromet.2007.08.026

Dhar, A.K., Roux, M.M. and Klimpel, K.R., 2002. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of Virological Methods*, 104(1), 69-82. DOI.org/10.1016/S0166-0934(02)00042-3

Dietzgen, R.G. and Kuzmin, I.V., 2012. Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-Vector Interactions, Cytopathology and Control. Caister Academic Press, Wymondham, 259 P.

Dobos, P., 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, 5, pp. 25-54. DOI:10.1016/0959-8030(95)00003-8

Einer-Jensen, K., Ahrens, P. and Lorenzen, N., 2005. Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(1-2), 39-45. DOI.10.3354/dao067039

Eissler, Y., Pavlov, M.S., Conejeros, P., Espinoza, J.C. and Kuznar, J., 2011. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment B as a target. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(3), 544-552. DOI: 10.3856/vol39-issue3-fulltext-14

Garver, K.A., Troyer, R.M. and Kurath, G., 2003. Two distinct phylogenetic clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia River basin. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(3), 187-203. DOI:10.3354/dao055187

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9), 1026. DOI:10.1038/nbt0993-1026

Hope, K.M., Casey, R.N., Groocock, G.H., Getchell, R.G., Bowser, P.R. and Casey, J.W., 2010. Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(1), 50-61. DOI.org/10.1577/H09-028.1

Jonstrup, S.P., Kahns, S., Skall, H.F., Boutrup, T.S. and Olesen, N.J., 2011. Validation of a Taqman based real time RT-PCR assay suitable for surveillance and diagnosis of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus worldwide. In *15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*.

Knüsel, R., Bergmann, S.M., Einer-Jensen, K., Casey, J., Segner, H. and Wahli, T., 2007. Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *Journal of Fish Diseases*, 30(9), 559-568. DOI:10.1111/j.1365-2761.2007.00842.x

Kurath, G., Garver, K.A., Troyer, R.M., Emmenegger, E.J., Einer-Jensen, K. and Anderson, E.D., 2003. Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

North America. *Journal of General Virology*, 84(4), 803-814. DOI:10.1099/vir.0.18771-0

López-Vázquez, C., Dopazo, C.P., Olveira, J.G., Barja, J.L. and Bandín, I., 2006. Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Virological Methods*, 133(2), 167-174. DOI:10.1016/j.jviromet.2005.10.033

Lopez-Vazquez, C., Bandín, I. and Dopazo, C.P., 2015. Real-time RT-PCR for detection, identification and absolute quantification of viral haemorrhagic septicaemia virus using different types of standards. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114(2), 99-116. DOI: 10.3354/dao02840

Mackay, I.M., Arden, K.E. and Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292-1305. DOI:10.1093/nar/30.6.1292

Niesters, H.G., Van Esser, J., Fries, E., Wolthers, K.C., Cornelissen, J. and Osterhaus, A.D., 2000. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 712-715. DOI: 10.1128/JCM.38.2.712-715.2000

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016. Aquatic animal health code, 15 edn. OIE, Paris. Available at www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-code/access.

Ørpetveit, I., Mikalsen, A.B., Sindre, H., Evensen, Ø., Dannevig, B.H. and Midtlyng, P.J., 2010. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(6), 886-895. DOI:10.1177/104063871002200606

Park, S., Zhang, Y., Lin, S., Wang, T.H. and Yang, S., 2011. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnology Advances*, 29(6), 830-839. DOI.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.017

Pierce, L.R., Willey, J.C., Palsule, V.V., Yeo, J., Shepherd, B.S., Crawford, E.L. and Stepien, C.A., 2013. Accurate detection and quantification of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSv) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. *PloS one*, 8(8), e71851. DOI:10.1371/journal.pone.0071851

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. and Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), pp. 154-160.

Snow, M., Bain, N., Black, J., Taupin, V., Cunningham, C.O., Skall, H.F. and Raynard, R.S., 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1-2), pp.11-21. DOI:10.3354/dao061011

Tapia, D., Eissler, Y., Espinoza, J.C. and Kuznar, J., 2017. Inter-laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 20-26. DOI:10.1016/j.ejbt.2017.05.008

Troyer, R.M., LaPatra, S.E. and Kurath, G., 2000. Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture. *Journal of*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

General Virology, 81(12), 2823-2832. DOI:10.1099/0022-1317-81-12-2823

Zorriehzahra, M.E.J., Rezvani, S., Mehrabi, M.R. Saeidi, A.A. and Soltani. M., 2005. Preliminary study of infectious agents (Viral and Bacterial) of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Mortality Syndrome in Iran, Final Research. Report, Iranian Fisheries Research Institute, 283P.

Zorriehzahra, M.E.J., HJ Mohd Daud, H., Bejo. H.M., Soltani, M. and Fallahi, R., 2019. Serological Survey of Epizootic Fish Viral Diseases in Some Rearing Rainbow Trout Farms by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) in Iran, *Cell and Cellular Life Sciences Journal*, 4(1): 000139, DOI: 10.23880/cclsj-16000139

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]

Using Real-Time PCR to Detect Notifiable Viral Diseases (IPN, VHS and IHN) in Specific Pathogen Free (SPF) Rainbow Trout Broodstock Generations

Zorriehzahra M.J.[1]; Yarmohammadi M.[2*]; Hosseini D.[3]; Pourkazemi M.[1]; Kazemi R.[2]; Sepahdari A.[1]; Ghasemi M.[4]; Kakoolaki S.[1]; Mehrabi M.R.[1]; Shenavar Masouleh; Ghiasi M.[5]

[*]mahtabyarmohammadi@gmail.com

1- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
2- International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
3-Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran
4- Inland Water Aquaculture Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Anzali, Iran
5- Ecology Research Center of the Caspian Sea, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

Abstract

The aim of this study was to identify different virulence pathogens using Real-Time PCR method for rapid and accurate detection of common viral diseases including Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN), Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) and Infectious Pancreatic Necrosis disease (IPN) in rainbow trout broodstock have been the main generation of reproductive populations maintained in the national plan for production the Specific Pathogen Free (SPF) fish. For this purpose, sampling was carried out on selected farms approved by the National Veterinary Organization in the provinces of Mazandaran, Kohgiluyeh and Boyerahmad and West Azerbaijan. Sampling of fish was done in different age groups and organs and was immediately frozen in liquid nitrogen. RNA extraction and Real-Time PCR experiments were performed using primers for the diseases. The results obtained using Real-Time PCR testing of healthy and suspected viral fishes showed the presence of VHS and IHN viruses in a number of selected farms, while the pathogenic virus IPN not detected. Based on the results of this study, it seems that Real-Time PCR can be used as a rapid diagnostic method in screening tests for rainbow trout viruses and as a complementary method for virus detection in routine tissue culture experiments.

Keywords: Rainbow trout, Viral diseases, Real-Time PCR, IPN, IHN, VHS

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.4.1.5]