بررسی مستمر سلامتی و عدم تایید وجود بیماری نکروز هماتوپویتیک عفونی (IHN) در مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در حومه یاسوج به وسیله روش های ملکولی (RT-PCR) و کشت سلولی در طی چهار سال ۱۳۹۴-۱۳۹۱.

محمدسعید گنجور[1*]، سید جلیل ذریه زهرا[2]، محمد رضا مهرابی[2]، علیرضا قائدی[1]، محدث قاسمی[3]، ابوالحسن راستیان نسب[1]

* ms.ganjoor@ifro.ir

۱-مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج.
۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، جمهوری اسلامی ایران.
۳-پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹٦

کلمات کلیدی: ماهی سرد آبی، بیماری ویروسی، IHN، روش ملکولی RT-PCR، ایران

ویروس IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) که به طور خلاصه به آن IHN می گویند از جمله عوامل عفونت زای مسری و مضر در قزل آلا است و سبب نوعی بیماری مهلک به عنوان "نکروز هماتوپویتیک عفونی" یا بیماری IHN می شود (مخیر، ۱۳۸۹؛ Eiras *et al*., 2008). شاید بتوان معادل فارسی این بیماری را "عفونت بافت خونساز یا عفونت امحاگر بافت خونساز" نامید.

این ویروس هم خانواده ویروس VHS است. اندازه آن ۱۹۰×۹۰ نانومتر، گلوله ای شکل، حاوی یک قطعه RNA بطول ۱۱ هزار نوکلوتید است. ماهیان زیر دو ماه حساس هستند و با بزرگ شدن، حساسیت آن ها کم می شود. این ویروس از طریق آب (Waterborne route) سرایت می یابد. در طبیعت، ماهیان وحشی مهمترین منبع بیماری هستند. در حال حاضر در اروپای غربی، آمریکا، کره، تایوان، ژاپن و چین ممکن است یافت شود (مخیر، ۱۳۸۹؛ King *et al*., 2012). بیماری حاصل از ویروس IHN تا به حال از کشورهای: اتریش، بلژیک، کانادا، چین، کروات، چک، فرانسه، آلمان، ایران، ایتالیا، ژاپن، کره، هلند، لهستان، روسیه، اسلونی، اسپانیا، ایالات متحده و سوئیس گزارش شده است (OIE, 2012).

این ویروس قادر به ایجاد تلفات سنگین در مزارع پرورش قزل آلا است. میزان تلفات ناشی از بیماری بستگی به مزمن یا حاد بودن عفونت در ماهیان و شرایط محیط استخر مثل دما و سن ماهیان دارد و از چند درصد تا ۹۵٪ متغیر است (Bootland & Leong, 1999). در هر حال یکی از راهکارهای توصیه شده برای کنترل این بیماری، ضد عفونی

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]

تخم ها است، که در این راستا استفاده از یدوفر توصیه شده است (Winton, 1991).

اجرای این پژوهش از دو جنبه اهمیت داشت. اول آن که بیماری IHN تاثیرات مخربی بر صنعت پرورش قزل آلا دارد و بایستی آنرا زیر نظر داشت و دوم، اینکه این صنعت دارای ارزش تولیدی، اقتصادی و اهمیت اجتماعی و کارآفرینی برای کشور است و بایستی از آن حمایت شود.

تعدادی از پژوهشگران، بروز بیماری IHN را در نقاطی از ایران گزارش نموده اند. آنها وقوع بیماری را در تخم و بچه ماهی و در مناطقی از کشور مثل لردگان و فارسان از استان چهار محال و بختیاری گزارش نموده اند. فراوانی نمونه های مثبت (IHN) در لردگان و فارسان بترتیب ۰/۸۳ و ۹/۱۶ درصد بوده است (فدایی‌فرد و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین، حضور این ویروس بکمک روش ELISA در برخی از نمونه های مربوط به استان های تهران، مازندران و کهگیلویه و بویر احمد گزارش شده است (Fallahi *et al.*, 2003). در سال ۷۹ گزارش شده که آنتی ژن‌های ویروس IHN در بچه ماهیان مناطقی از کهگیلویه و بویر احمد و فارس بترتیب تا سن ۳۰۰ و ۸۰ روزگی بروش مذکور قابل شناسایی بوده است (اخلاقی، ۱۳۷۹). سلطانی و همکاران ۱۳۹۳، پراکنش جغرافیایی بیماری IHN را بروش مولکولی (RT_PCR) در ۱۸ استان کشور در طی سال های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ مورد بررسی قراد دادند. در این بررسی، از ۱۸ استان مورد مطالعه تنها از استان های آذربایجان شرقی، فارس و لرستان بترتیب با فراوانی ۲۲/۲، ۴ و ۷/۱۴ درصد، ویروس IHN از لارو قزل آلای رنگین کمان پرورشی جداسازی شد. درکل، از ۲۱۴ نمونه مربوط به ۱۸ استان تنها ۴ نمونه مثبت IHN شناسایی شد، بدین ترتیب فراوانی کل را می توان ۱/۸۶ درصد عنوان نمود. حقیقی خیابانیان اصل و همکاران در سال ۲۰۰۷، تعداد ۱۰۰ نمونه مربوط به ۱۰۰ کارگاه از ۱۷ استان را به دو روش ایمونوهیستوشیمی و PCR مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها فراوانی ویروس مذکور را بر اساس روش ایمونوهیستوشیمی و PCR بترتیب ۳۵ و ۴۳ درصد عنوان نمودند که از نمونه های ۱۴ استان حاصل شده بود. در بررسی دیگری، از ۳۰ استخر مربوط به ۳۰ هچری قزل آلا تعداد ۱۵۰ عدد لارو مورد آزمایش قرار گرفتند. در این بررسی لاروهای ۱۰ مزرعه (۳۳ درصد مزارع) آلوده به ویروس IHN بودند(Raissy *et al.*, 2010). بر اساس این تحقیقات، حضور ویروس IHN در طی سال‌های ۷۹ تا ۹۳ و از ۱۴ استان از جمله کهگیلویه و بویراحمد رهگیری گردیده است. لذا حضور ویروس IHN در استان کهگیلویه و بویراحمد در سال های گذشته محرک و دلیل اجرای این تحقیق بود.

امروزه، شایسته است که توجه خاصی به تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان و تحقیق و توسعه آن شود. این محصول اگر جزء محصولات استراتژیک نباشد اما دست کمی از این محصولات ندارد. طبق آمارها در سال ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در استان کهگیلویه و بویر احمد بترتیب ۱۳۴۰۰ و ۱۱۰۴۵ تن قزل آلای رنگین کمان پرورشی تولید شده است. ۳۰ استان در سال ۱۳۹۳ تولید قزل آلا داشته اند که بیشترین آمار مربوط به استان مازندران با ۱۹۷۳۷ تن بوده است. حتی، استان سیستان و بلوچستان که از جمله استان های خشک کشور است ۱۱ تن تولید داشت. در همین سال در کل کشور ۱۲۶۵۱۵ تن قزل آلا تولید شده است که نسبت به سال ۱۳۹۲، میزان ۱۷۴۰۲ تن کاهش داشته است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۲-۱۳۹۳). قیمت قزل آلا بطور متوسط کیلویی ۱۰۰۰۰ تومان است. بنابراین، ارزش قزل آلای پرورشی کل کشور در سال ۱۳۹۳ معادل ۱۲۶۵۱۵۰۰۰۰۰۰۰ تومان بوده است. این مبلغ نشانگر ارزش اقتصادی قزل آلا در چرخه صنعت کشور و صنایع وابسته به آن و اشتغال زایی است. بعلاوه نشان می دهد که ایجاد این صنعت در کشور، یکی از بزرگترین پروژه های کارآفرینی بوده است. از سوی دیگر، اگر هر ۵۰۰ گرم قزل آلا به عنوان یک پرس غذای کامل برای یک نفر در نظر گرفته شود، در سال ۹۳، میزان قزل آلای تولیدی کشور برای تهیه ۲۵۳۰۳۰۰۰۰ پرس غذا کافی بوده است. این رقم نشانه برداشت گام های موثر در خودکفایی و استقلال غذایی کشور بوده است.

مکان آزمون، یکی از کارگاه های تکثیر قزل آلای رنگین کمان پرورشی واقع در منطقه دشتروم (تنگاری) از توابع استان کهگیلویه و بویر احمد بوده است. گونه مورد مطالعه، ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی(*Oncorhynchus mykiss*) بوده که از نظر ابتلاء به گونه ویروسی IHNV متعلق به جنس نوی-رابدوویروس (*Novirhabdovirus*) مورد بررسی قرار گرفت (King *et al.*, 2012).

زمان اجرای تحقیق، چهار سال از ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴ بود.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]

جمعیت مورد بررسی، جمعیت مولدین کارگاه که بطور تقریبی بالغ بر ۳۰۰۰ مولد می شد. هر سال یک درصد مولدین نمونه برداری شدند. بنابراین در طی چهار سال ۱۲۰ نمونه (مولد نر و ماده، ۵۰%+۵۰%) بررسی شد. همچنین از محصولات حاصل از مولدین نمونه برداری شد. نمونه ها شامل مولد و پیش مولد (مولد جوان) می شد. هم از اسپرم و تخمک (تخم لقاح نشده) آنها و هم از بافت های هدف مولدین شامل (کلیه، طحال و کبد) نمونه برداری انجام شد. بعلاوه از تخم چشم زده، لارو و بچه ماهی ها نیز نمونه برداری به عمل آمد.

تمامی نمونه ها در لوله پلاستیکی فالکون حاوی محیط انتقال ویروس VTM (Virus Transport Media) ریخته شدند و توسط تانک ازت مایع به محل آزمون ارسال شدند. به جز نمونه های سیال مثل اسپرم و ترشحات تخمدان که مایع بودند، بقیه نمونه ها هموژنیزه شدند و به دو تیره سلولی BF_2 و EPC تلقیح شدند. کلیه کشت ها از ۷۲ ساعت تا ۷ روز از نظر بروز عوارض سلولی مورد بررسی قرار گرفتند (Fallahi *et al.*, 2003; Johnson, 1990). سپس، مرحله بعدی آزمایش یعنی فرآیند PCR بر روی آنها انجام شد. عمل PCR به کمک کیت One Step ساخت شرکت کیاژن انجام گردید. مرحله تزاید دی-ان-ای (Ampification) به کمک دستگاه ترمال سایکلر (MyGene®) انجام گرفت. پرایمر بکار رفته دارای آرایش بازی ذیل بود (فدایی فرد و همکاران، ۱۳۹۱؛ Raissy *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 1999):

IHN3: GTTCAACTTCAACGCCAACAGG

IHN4: TGAAGTACCCCACCCCGAGCATCC

سپس، تمامی نمونه ها بر روی ژل در دستگاه الکتروفورز (ساخت ایران) برده شد تا فرآیند تفکیک قطعات DNA در میدان الکتریکی انجام شود. بررسی ژل ها و صحت حضور یا عدم حضور باند ویروسی به کمک دستگاه ژل داکیومنت (مارک Transilluminator-ساخت فرانسه) و زیر تابش نور فرابنفش انجام شد و ژل ها از نظر ایجاد باند متعلق به ویروس بررسی شدند.

جهت جمع بندی نتایج، ابتدا تاریخچه مولدین بررسی گردید. تاریخچه مولدین نشان داد که بعضی اوقات تلفات در آنها رخ داده است و حتی در بچه ماهیان تلفات شدید دیده شده است. اما پیشینه‌ای مبنی بر حضور ویروس IHN و یا انجام آزمون هایی برای شناسایی آن بدست نیامد. سپس، علائم ظاهری و علائم بالینی نمونه ها ملاک تشخیص بیماری قرار گرفت. در کالبد گشایی نمونه ها به جز موارد بسیار معدود، مورد خاصی مبنی بر وجود لکه های خونی، خونریزی یا آب آوردگی شکم مشاهده نشد. در کل نتایج حاصل از کالبد گشایی و تشریح بافت نمونه ها و تاریخچه، نشانه ای حاکی از بروز بیماری IHN نبود. در ادامه نتایج حاصل از کشت سلولی و PCR بررسی شد. نتیجه PCR به عنوان نتیجه نهایی و ملاک قضاوت در خصوص آلودگی نمونه ها قرار گرفت. این نتایج بیانگر حضور عامل ویروسی IHN در هیچ یک از نمونه ها نبود. لذا از نظر آماری فراوانی ویروس در نمونه های مورد بررسی صفر بود و عملاً مولدین کارگاه مذکور عاری از آلودگی به ویروس IHN تلقی شدند. جهت اطمینان از نتایج حاصل و اطمینان از عدم کاذب بودن نتایج مقرر شد که روش کار بازنگری گردد. نتیجه حاصل از بازنگری نشان داد که روش کار صحیح بوده است. و ممیزی نتایج نقصی در روش کار را آشکار نکرد. بر این اساس ادعای عاری بودن مولدین از ویروس IHN بعنوان نتیجه پژوهش تایید شد. هر چند در این پژوهش ویروس IHN جداسازی نشد اما یافته مهمی حاصل شد مبنی بر اینکه مولدین و بچه ماهیان موجود عاری از ویروس IHN بودند و ویروس IHN عامل تلفات احتمالی نبوده است. ضمنا، با توجه به استفاده از شاهد (کنترل مثبت) و بازنگری و ممیزی روش کار، صحت نتیجه آزمایشات قابل قبول بود. به عبارت بهتر وجود جواب منفی کاذب، منتفی دانسته شد. لذا سلامت مولدین (عدم حضور IHN) با این روش تایید گردید و اطمینان حاصل شد که کارگاه مذکور با ویروس IHN دست به گریبان نبوده است. البته بررسی سایر بیماریها (غیر از IHN) ادامه یافت.

البته، احتمال حضور این ویروس در ایران مردود ندانسته‌اند، بنابراین، خطر بروز و شیوع این بیماری همواره نا محتمل نیست (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ فدایی فرد و همکاران، ۱۳۹۱؛ اخلاقی، ۱۳۷۹؛ Haghighi Khiabanian asl *et al.*, 2007). بطور مثال، تحقیقی از ۳۰ کارگاه پرورش استان چهار محال و بختیاری نشان داده است که یک سوم کارگاه ها با ویروس مذکور درگیر بوده اند(Raissy *et al.*, 2010). هر چند که مقالات حاصل از بررسی شیوع ویروس IHN در ایران اندک هستند و یا ملاحظاتی جهت چاپ آنها بعمل می آید اما بطور قطع حضور این ویروس در ایران قابل

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]

رهگیری است. چنان که، در طی تحقیق که از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ بعمل آمد، تعداد۴۲۰ نمونه از شش استان کشور جهت ویروس IHN به روش کشت سلولی، میکروسکوپ الکترونی و ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. که تنها هشت نمونه مثبت شناسایی شد که مربوط به استان های تهران، مازندران و کهگیلویه و بویر احمد بوده است. البته در این تحقیق ویروس شناسایی شده را "شبه IHN" گزارش نموده اند(Fallahi *et al.*, 2003). بعلاوه، یک مطالعه هیجده ماهه به منظور شناسایی ویروس IHN بر روی بچه ماهیان قزل آلای استان های فارس و کهگیلویه و بویر احمد بعمل آمده است. در این تحقیق ۱۵۳ نمونه بافتی و ۶۰۷ نمونه ماهی مربوط به پنج مزرعه به روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت و وجود آنتی ژن این ویروس در ماهیان زیر یکسال در هر دو استان اعلام شد (اخلاقی، ۱۳۷۹). در هر حال، در تحقیق حاضر مستنداتی مبنی بر حضور ویروس در منطقه مورد مطالعه در بازه زمانی مذکور بدست نیامد.

منابع

اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. مطالعه ایمونولوژیکی بیماری‌های ویروسی مشکوک به نکروز عفونی بافت‌های خونساز و لوزالمعده‌ای ماهی قزل‌آلا. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز). ۱(۲): ۸۵ - ۹۵.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران.، ۱۳۹۲-۱۳۹۳. سازمان شیلات ایران، تهران.

سلطانی، م.، روح الهی، ش.، زرگر، ا.، عبدی، ک.، محمدیان، س. و قاجاری، ا.، ۱۳۹۳. مطالعه پراکنش بیماری نکروز عفونی پانکراس در مزارع قزل آلای ایران به روش RT-PCR. مجله دامپزشکی ایران، ۱۰(۲): ۲۹-۳۸.

فدایی فرد، ف.، رئیسی، م.، مومنی، م. و فغانی، م.، ۱۳۹۱. بررسی آلودگی تخم های قزل آلای رنگین کمان ایرانی و خارجی به ویروس های نکروز عفونی مراکز خونساز، سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی و نکروز عفونی لوزالمعده: یک مطالعه مقطعی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ، ۶۷(۴): ۳۹۳-۳۹۹.

مخیر، ب.، ۱۳۸۹. بیماریهای ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران، ۶۳۸ صفحه.

Bootland, L.M. and Leong, J.C., 1999. Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Woo P.T.K. & Bruno D.W., (eds) Fish Diseases and Disorders, Volume 3(Viral, Bacterial and Fungal Infections), CAB International, Oxon, UK, pp: 57–121.

Eiras, C.J., Segner, H., Wahli, T. and Kapoor, B.G., 2008. Fish Diseases. 2 Volume set. Scientific Publishers (www.scipub.net), New Hampshire, USA. 1312 p.

Fallahi, R., Soltani, M., Kargar, M., Zorriehzahra, M.E.J., Shchelkunov, I., Hemmatzadeh, F. and Nouri, A., 2003. Isolation and Identification of the Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV)-like Agent from Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Iran. Arch. Razi Ins, 56: 37-45.

Haghighi Khiabanian Asl, A., Soltani, M., Kazemi, B., Sohrabi Haghdost, I. and Sharifpour, I., 2007. Use of immunohistochemical and PCR method in diagnosis of infectious haematopoietic necrosis disease in some rainbow trout hatcheries in Iran. Pakistan J. Bio. Sci. 10 (2): 230-234.

Johnson, F.B., 1990. Transport of viral specimens. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. 3(2): 120-131.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J., 2012. Virus taxonomy "classification and nomenclature of viruses". Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies, Virology Division. ELSEVIER ACADEMIC PRESS. London, UK. 1273 p.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]

OIE, 2012., Chapter: 2.3.4, INFECTIOUS HAEMATOPOIETIC NECROSIS. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Pp: 300-313.

Raissy, M., Momtaz, H., Ansari, M. and Moumeni, M., 2010. Diagnosis of infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout hatcheries, Iran. African Journal of Microbiology Research, 4(18): 1868-1871.

Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J.T. and Nicholson, B.L., 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 37(12): 4139–4141.

Winton, J.R., 1991. Recent advances in the detection and control of infectious *hematopoietic necrosis virus* (IHNV) in aquaculture. Ann. Rev. Fish Dis., 1: 83–93.

Wistreich, G.A., 1997. Microbial laboratory. Fundamental and applications. Prentice- Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey, USA, pp: 334-342.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]

Continuous health monitoring and disapproval of IHN (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) presence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock by cell culture and molecular methods (RT-PCR) from 2012 to 2016 in the suburb of Yasuj (Iran).

Ganjoor M.S.[1*]; Zorriehzahra S.J.[2]; Mehrabi M.R.[2]; Ghaedi A.R.[1]; Ghasemi M. [3]; Rastiannasab A.[1]

* ms.ganjoor@ifro.ir

1-Genetic and Breeding Research Centre for Cold Water Fishes (Shahid-motahari Center), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO), Yasuj, I.R.Iran.
2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Islamic Republic of Iran.
3-Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

Abstract

IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) is one of the most important pathogens in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The virus causes the disease that affects the hematopoietic tissue and blood vessels of fish, especially in larvae and fingerling stages. The disease is highly contagious and causes mass fish casualty (up to 95%). Therefore, continuous health monitoring of fish farms is necessary. The objectives of the present study were to identify and track the probable presence of the virus in fish farm in Dasht-e-Rome, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran. Samples were prepared from the liver, spleen, kidney, egg, sperm and larvae of the adult fish and broodfish during four years from 2012 to 2016. About one percent of the broodstock population was used for sampling (1%×3000 broodfish×4years=120fish). In order to detect the presence of IHN-virus, samples were sent to a laboratory in frozen condition. After preparation of samples, they were inoculated with two types of cell line (BF2 and EPC) and examined by the molecular methods (Reverse Transcriptase-PCR) to detect the presence of IHN virus. The results showed that all samples were free from the IHN virus and the frequency of virus was 0% in all examined samples.

Keywords: Cold water fish, Viral disease, IHN, RT-PCR molecular method, Iran.

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2024-11-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.16.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113967]