# معرفی روش مولکولی PCR آشیانه‌ای (Nested RT-PCR) اصلاح شده جدید جهت تشخیص سریع بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis)

فاطمه حسن‌تبار[۱]، فرید فیروز بخش[۱]، سید محمد جلیل ذریه‌زهرا[*۲]، کیم تامپسون[۳]

[*]zorrieh@yahoo.com

۱- گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳-گروه پژوهش های آبزی پروری، موسسه تحقیقات Moredun، اسکاتلند

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

## چکیده

بیماری نکروز عصبی ویروسی، یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی با گسترش جهانی در ماهیان دریایی و پرورشی دنیا محسوب می‌شود و تا به امروز بیش از ۷۰ گونه حساس ماهی به این بیماری شناسایی شده است. هدف از این پژوهش ردیابی و شناسایی سریع ویروس مذکور با استفاده از روش Nested RT-PCR از بافت مغز کفال ماهیان دریای خزر بود. در طول فصل صید در سال ۱۳۹۵ تعداد ۴۰ قطعه کفال طلایی (*Liza aurata*) در محدوده وزنی ۵۰ تا ۲۵۰ گرم با علائم مزمن بیماری از سواحل دریای خزر جمع آوری شدند و پس از جداسازی بافت مغز و استخراج RNA ویروس، با استفاده از روش ترانس کریپتاز معکوس، سنتز cDNA از روی RNA ژنوم ویروس صورت گرفت. سپس با روش Nested RT-PCR و با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی F2/R3 وNF2/NR3 طی دو مرحله، قطعه مورد نظر تکثیر و توالی یابی شد. پس از بهینه سازی شرایط، واکنش PCR با استفاده از نمونه‌ی کنترل مثبت، در PCR مرحله ی اول (RT-PCR) در هیچ یک از نمونه‌های مشکوک کفال ماهیان باند مورد نظر مشاهده نشد. اما در دور دوم PCR (Nested RT-PCR ) در ۲۰ مورد از ۴۰ نمونه کفال ماهیان یک باند واضح bp ۳۰۰ مشاهده شد. براساس نتایج بنظر می‌رسد که Nested RT-PCR می‌تواند به عنوان روشی مناسب برای تشخیص سریع سطوح پایین آلودگی و همچنین یک روش مناسب و کاربردی برای شناسایی ماهیان حامل آلوده و به ظاهر سالم در نظر گرفته شود. همچنین نتایج حاصل از توالی یابی نشان داد که ویروس مورد نظر در کفال ماهیان دریای خزر، متعلق به ژنوتیپ RGNNV می‌باشد.

**لغات کلیدی:** نکروز عصبی ویروسی، ماهی کفال، Nested RT-PCR، توالی‌یابی

[*]**نویسنده مسئول**



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

## مقدمه

نکروز عصبی ویروسی (VNN)[1] یا بیماری مغزی و شبکیه‌ای ویروسی (VER)[2] یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی با گسترش جهانی در ماهیان دریایی و پرورشی است. این ویروس از جنس بتانوداویروس (*Betanodavirus*) و خانواده نوداویریده (Nodaviridae) می‌باشد (Thiéry *et al*., 2011). بتانوداویروس‌ها فاقد پوشش، کروی، با اندازه تقریباً ۲۵ نانومتر و دارای دو مولکول RNA تک رشته‌ای (با قطبیت) مثبت بدون دم پلی A در انتهای ۳' هستند (Mori *et al*., 1992). این ویروس دارای ۴ ژنوتیپ SJNNV[3]، TPNNV[4]، BFNNV[5] و RGNNV[6] است (Nishizawa *et al*., 1997). به لحاظ اختصاصی بودن میزبان بنظر می‌رسد که ژنوتیپ RGNNV (دمای رشد بهینه: ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) مختص ماهیان گرمابی و ژنوتیپ BFNNV (دمای رشد بهینه: ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد) مختص گونه‌های سردآبی باشد (Grotmol *et al*., 1999; Tanaka *et al*., 1998). با بروز بیماری، ماهیان بیمار طیف وسیعی از اختلالات عصبی را نشان می‌دهند که علائمی همچون کاهش اشتها، تغییر رنگ (تیرگی و نیز رنگ پریدگی)، شنای نامتعادل (شنای چرخشی)، بیرون زدگی چشم، تورم شدید کیسه شنا و شنا در وضعیت خوابیده بر پشت، از علائم شاخص این بیماری ویروسی می‌باشد. مهمترین ضایعه آسیب‌شناسی مشاهده شده در این بیماری بروز واکوئولاسیون و نیز نکروز سلول‌های عصبی در بافت عصبی مرکزی و شبکیه است (Azad *et al*., 2005; Fukuda and Nguyen, 1996).

تاکنون این بیماری در بیش از ۷۰ گونه از ماهیان در دنیا گزارش شده است که عمده این گزارش‌ها مربوط به ماهیان دریایی می‌باشد. این بیماری در بسیاری از گونه‌های ماهیان آب شیرین نیز شناسایی شده است (Munday *et al*., 2002; Athanassopoulou *et al*., 2004; Bigarré *et al*., 2009). ویروس این بیماری ممکن است منجر به مرگ و میر و تلفات صد درصدی در لاروها و بچه ماهیان گردد و موجب خسارات قابل توجهی در ماهیان بالغ شود. این بیماری پراکندگی جغرافیایی گسترده‌ای دارد و در اقیانوسیه، امریکای شمالی، نروژ، آسیای شرقی و جنوبی، کشور های حوزه دریای مدیترانه، بریتانیا و اخیراً در برخی کشورهای آفریقائی همچون الجزایر، تونس، سنگال و لیبی نیزگزارش شده است (Crane and Hyatt, 2011; Sahoo and Goodwin, 2012). انتقال بیماری به صورت افقی و عمودی صورت می‌گیرد و می‌تواند برای مدتی طولانی در میزبان به صورت تحت بالینی باقی بماند و تحت شرایط محیطی نامساعد باعث مرگ و میر شدید شود (Samuelsen *et al*., 2006).

در ایران این بیماری اولین بار با تمامی نشانه‌های شاخص بالینی خود در بهمن ماه سال ۱۳۸۲ از کفال ماهیان طلایی (*Liza auratus*) دریای خزر شناسائی و گزارش شد (Zorriehzahra *et al*., 2005). متاسفانه هر ساله شاهد تلفات و کاهش صید کفال ماهیان دریای خزر هستید، بطوریکه صید ماهی کفال از ۶۴۴۶ میلیون تن در سال ۲۰۰۲ به ۲۷۸۰ میلیون تن در سال ۲۰۰۹ کاهش یافته است (Nazari *et al*., 2014). آمار رسمی سازمان شیلات ایران نشان داده است که در پنج سال اخیر هیچگاه میزان صید سالانه کفال ماهیان از ۳۰۰۰ تن در سال فراتر نرفته است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۵). در واقع، مرگ و میر ماهیان کفال می‌تواند زنگ خطری برای زیست بوم حساس خزر باشد. احتمال می‌رود که ویروس مذکور با توجه به دامنه وسیع میزبان‌های آن (ماهیان آب شیرین و شور) پس از سازگاری با شرایط فیزیولوزیک می‌تواند به عنوان یک عامل تهدید کننده اساسی برای سایر ذخایر ماهیان استخوانی و ماهیان خاویاری در حوزه جنوبی دریای خزر محسوب شود، بطوریکه در مطالعات تکمیلی که در طرح جامع موسسه

[1]. Viral Nervous Necrosis
[2]. Viral Encephalopathy and Retinopathy
[3]. Striped jack nervous necrosis virus
[4]. Tiger puffer nervous necrosis virus
[5]. Barfin flounder nervous necrosis virus
[6]. Red-spotted grouper nervous necrosis virus



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

تحقیقات علوم شیلاتی کشور طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۵ در سه استان شمالی کشور صورت گرفت، بیماریزائی ویروس جدا شده از کفال ماهیان بر بچه ماهیان خاویاری (*Huso hoso*) نیز به اثبات رسید (Zorriehzahra *et al.*, 2013).

در برنامه‌های پایش و مراقبت، ردیابی و تشخیص سریع ویروس قبل از ظهور علائم بالینیT بسیار ضروری می باشد اقدامات مدیریتی بهداشتی و درمانی لازم برای جلوگیری از شیوع بیماری می‌تواند بسرعت انجام پذیرد و از گسترش آن جلوگیری نماید. روش‌های مختلفی برای تشخیص بتانوداویروس مانند روش‌های میکروسکوپی، مولکولی، سرولوژیک و روش کشت سلول در دسترس می باشند که هر یک معایب و مزایایی دارند که در این میان روش مولکولی PCR (RT-PCR, Nested RT-PCR, Real-time PCR) با توجه به دقت، سرعت و حساسیت آن، نظر محققین را بخود معطوف نموده است. این روش در سال‌های اخیر برای تشخیص و نیز برای تعیین گونه بتانوداویروس‌ها استفاده شده است (Shetty *et al.*, 2012). در این بین، روش Nested -PCR همواره به عنوان روشی ساده، سریع و قابل اعتماد جهت تایید محصول PCR بکار گرفته می‌شود. این روش، شکل تغییر یافته‌ای از PCR معمول است که در دو مرحله با استفاده از آغازگرهای خارجی و داخلی که بترتیب در مراحل اول و دوم واکنش وارد می‌شوند، انجام می‌شود. در واقع، محصولات PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای یک جفت آغازگر داخلی مورد هدف قرار می‌گیرد و نتیجه کار تولید محصولاتی با اندازه‌های کوچکتر خواهد بود (McPherson & Simon, 2006). لذا، این روش نسبت به روش‌های ساترن بلات (Southern blot) و هیبریداسیون و ایمنوهیستوشیمی بسیار آسانتر است و سریعتر انجام می‌شود (Thiery *et al.*, 1999).

هدف از این مطالعه ردیابی و شناسایی ویروس مذکور با استفاده از روش Nested RT-PCR در تعدادی از نمونه‌های جمع آوری شده و مشکوک کفال ماهیان دریای خزر و بررسی آن به عنوان یک روش تشخیص سریع بوده است.

## مواد و روش کار

### جمع آوری نمونه

در طول فصل صید در سال ۱۳۹۵، تعداد ۴۰ قطعه کفال طلایی با علائم مزمن بیماری در محدوده وزنی ۲۵۰-۵۰ گرم از سواحل جویبار، فریدونکنار و سرخرود استان مازندران جمع‌آوری گردیدند و بلافاصله در مجاورت یخ به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم دامی وشیلات دانشگاه منابع طبیعی و کشاورزی ساری منتقل شدند. بعد از جداسازی سریع بافت مغز در شرایط کاملاً استریل و در زیر هود، در فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره شدند.

اکثر ماهیانی که در این زمان صید شدند، علائم مزمن بیماری را از خود نشان می‌دادند، اغلب آنها دارای بدنی کشیده، لاغر و دوکی شکل با سرهای بزرگ بودند و همچنین عضلات و بافت‌های بدن شل و فاقد استحکام لازم بودند. در کالبدگشائی بافت‌های داخلی همچون کبد و کلیه و طحال بیرنگ و رنگ پریده و آثار کم خونی شدید در بافت‌ها قابل مشاهده بود. خون ماهیان مبتلا نیز اغلب صورتی رنگ بود و آثار کم خونی شدید در آنها آشکار بود.

### استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های نگهداری شده در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از محلول RNX-Plus (شرکت سیناکلون ایران) و ساخت cDNA با کیت سنتز AccuPower CycleScript PreMix with dN6 (شرکت BIONEER کره جنوبی) مطابق با دستورالعمل شرکت‌های سازنده کیت انجام گرفت .کمیت و کیفیت RNA استخراج شده بترتیب با روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز بر ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. در روش اسپکتوفتومتری میزان خلوص و میزان آلودگی به ترکیبات پروتئینی RNA بترتیب با بررسی نسبت میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طول موج‌های ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) و ۲۳۰ نانومتر (۲۶۰/۲۳۰) تعیین شد.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

**طراحی و سنتز آغازگر**

در این پژوهش از دو جفت آغازگر عمومی مندرج در پروتکلOIE استفاده گردید (OIE, 2013) که توالی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. این آغازگرها بر اساس ناحیه T4 ژن پروتئین پوشش ویروس نکروز عصبی طراحی گردید و جهت ساخت از طریق شرکت ژن فن آوران به شرکت کوپنهاژن دانمارک (Copenhagen) ارسال شدند.

**جدول ۱:توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق**

**Table 1: Primer Sequences used in the study.**

| پرایمر(آغازگر) | ژن هدف | توالی ۳'- ۵' | اندازه محصول (جفت باز) |
|---|---|---|---|
| F2: External Forward<br>R3: External Reverse | RNA2 | CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT<br>CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA | ۴۲۰ |
| NF2: Internal Forward<br>NR3: Internal Reverse | RNA2 | GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC<br>GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA | ۲۹۴ |

**کنترل**

برای اطمینان از صحت واکنش PCR در هر مرحله از واکنش از نمونه کنترل مثبت و منفی استفاده شد. نمونه کنترل منفی حاوی تمام مواد واکنش بجز نمونه RNA یا cDNA بود (که در آن به جای TEMPLE از آب عاری از آنزیم نوکلئاز استفاده شد) . همچنین از RNA یا cDNA استخراج شده از لاروهای ( *Epinephelus coioides*) گروپر نارنجی خالدار مبتلا به بیماری، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نمونه‌های RNA یا cDNA از دپارتمان بیوتکنولوژی کالج مهندسِی Rajalakshmi کشور هندوستان دریافت و مورد استفاده قرار گرفت. شایان توضیح است، از آنجایی که اکثر نمونه‌های کفال ماهیان در زمان انجام این پژوهش دارای علائم مزمن بیماری بودند، نیاز به Set up نمودن روش PCRبود و متاسفانه RNA کفال ماهیان با حدت بیماری زایی بالا یافت نشد و در داخل کشور نیز cDNA مورد نظر در دسترس نبود. از سوی دیگر، در مطالعات قبلی مشخص شد که سوش کفال دریای خزر متعلق به ژنوتیپ RGNNV می‌باشد و همچنین نمونه هامور ماهیان نیز از همان سویه بودند. همچنین نمونه کنترل مثبت مذکور جهت اطمینان بیشتر، مجدداً تعیین توالی شدند و ژنوتیپ RGNNV آن محرز گردید.

**آزمایش PCR آشیانه‌ای (Nested RT-PCR)**

آزمون PCR آشیانه‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای بیرونی F2/ R3 و جفت آغازگرهای داخلی NF2/NR3 به صورت دو مرحله‌ای انجام شد (Thiery *et al*., 1999).

**شرایط آزمون Nested RT -PCR دو مرحله‌ای**

برای انجام مرحله اول PCR (RT-PCR) از آغازگرهای بیرونی F2/ R3 استفاده شد. جهت بهینه‌سازی واکنش پارامترهایی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، دمای اتصال و غلظت نهایی آغازگرها و غلظت نهایی cDNA و محصول PCR بودند. واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵میکرولیتر Master mix PCR 2X (سیناکلون ایران)، ۱-۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر پیشین و پسین، ۴/۵ مایکرو لیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱-۴ میکرولیتر cDNA انجام شد. PCR تحت شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۴ دمای مختلف، ۵۵، ۵۷/۱، ۵۹/۲، ۶۱/۷ ، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد ( Moody and Crane, 2014). سپس از محصول دور اول به عنوان الگویی برای



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

دور دوم استفاده شد. مواد و شرایط دوم نیز به قرار ذیل بود:
۱۲/۵میکرولیتر Master mix PCR 2X (سیناکلون ایران)، ۱-۰/۳ میکرولیتر ازآغازگرهای داخلی NF2/NR3، ۴/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱-۴ از میکرولیتر محصول PCR دور اول در یک میکروتیوپ ۰/۲ میکرولیتری اپندروف (Eppendorf) (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) ریخته شد. آنگاه دور دوم مطابق با برنامه ذیل انجام شد: ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۴ دمای مختلف ۵۰، ۵۲، ۵۴، ۵۵ درجه سانتی‌گراد گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله گسترش نهایی (Moody and Crane, 2014).

### الکتروفورز

نمونه‌های حاصل از PCR بر ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی بافر TBE (1x) الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل نیز به کمک اتیدیوم بروماید انجام گرفت. جهت قرار دادن نمونه‌های حاصل از PCR به درون چاهک‌های ژل از بافر نمونه‌گذاری X ۶ استفاده شد و با پایان یافتن زمان الکتروفورز ژل به دستگاه Gel Doc (شرکت Bio-Rad آمریکا) منتقل شد و با اشعه ماوراء بنفش باندها مشاهده گردید.

### تهیه محصول PCR جهت توالی یابی

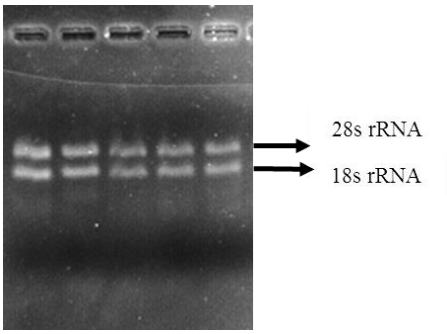
برای این قسمت واکنش های PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه شد تا حجم نهایی بیشتری از محصول PCR بدست آید. این محصولات پس از بررسی و تایید با الکتروفورز جهت خالص‌سازی نهایی استفاده گردید.

### خالص سازی محصول PCR

خالص سازی مستقیم DNA از محصول PCR به کمک کیت AccuPrep Gel Purification kit (شرکت Bioneer کشورکره جنوبی) انجام شد و جهت توالی یابی نیز به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید.

## نتایج

برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده از بافت مغز، ۵ میکرولیتر از RNA روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و در دستگاه Gel doc مشاهده شد. همانطوریکه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باندهای ریبوزومی ۲۸S و ۱۸ S قابل تشخیص بودند. در واقع، وجود این باندها که بدون تخریب و شکستگی و به صورت سالم و یکپارچه هستند، حاکی از بالا بودن کیفیت RNA استخراج شده می‌باشد. نتایج اسپکتوفتومتری نیز بیانگر کیفیت خوب RNA استخراج شده بود. در جدول ۲ مشخصات RNA استخراجی ارائه شده است.




**شکل ۱: کیفیت RNA استخراج شده از نمونه‌های مغز ماهی کفال طلایی بر ژل آگارز ۱٪ ؛ ۲ زیر واحد RNA ریبوزومی (18S و 28S) که شاخص کیفیت RNA بخوبی مشاهده می‌شود.**

**Figure 1: The qualification of RNA extraction of golden grey mullet brains on 1% agarose gel; 2 subunits of ribosomal RNA (18S and 28S) are completely observed.**

**جدول ۲: نتایج اسپکتوفتومتری RNA استخراج شده از نمونه‌های مغز ماهی کفال طلایی**

**Table 2: spectrophotometric results from RNA extraction of golden grey mullet brains.**

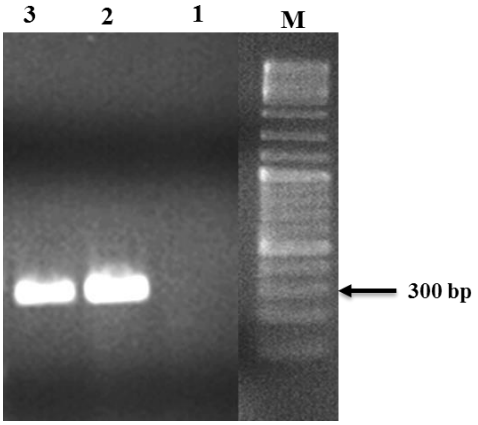
| نسبت طول موج ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر | نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر | غلظتRNA (نانوگرم/میکرولیتر) |
|---|---|---|
| ۲/۶۲ | ۱/۸ | ۷۴۸ |



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

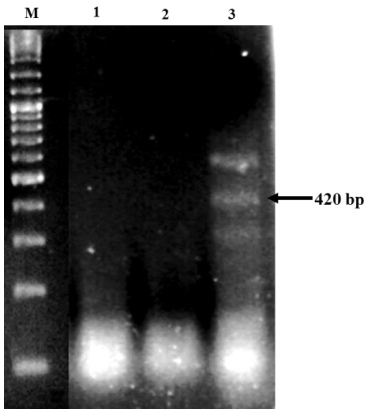
از آنجایی که بهینه سازی واکنش PCR برای تشخیص میزان کم ژنوم ویروس در نمونه های بالینی بسیار حائز اهمیت است، در این مطالعه رقت‌های مختلف cDNA و محصولات مرحله اول PCR بررسی شد. همچنین با کمک شیب دمایی، مناسب‌ترین دما برای هر دور PCR تعیین شد. در نتایج حاصل از این پژوهش، غلظت بهینه cDNA و محصول PCR ۲ میکرولیتر بود و دمای بهینه برای دور اول و دوم PCR بترتیب ۵۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR با استفاده از نمونه کنترل مثبت (لارو ماهی grouper)، وجود یا فقدان ویروس در نمونه‌های مغز کفال ماهیان بررسی گردید. شایان ذکر است که سویه لارو هامور تعیین توالی شد و تایید گردید که متعلق به ژنوتیپ RGNNV می‌باشد.

از مجموع ۴۰ نمونه مشکوک به نکروز عصبی ویروسی، ۲۰ مورد (۵۰٪) آلوده به این ویروس بودند. این یافته با تکثیر قطعه حدود ۳۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NF2/NR3 اثبات گردید (شکل ۲). شایان ذکر است که در این روش پس از آنکه محصولات دور دوم در ژل آگارز برده شد، یک باند ۳۰۰ bp نسبتاً واضح در نمونه‌های کنترل مثبت و کفال ماهیان آلوده قابل مشاهده بود. این در حالیست که در PCR مرحله اول که با استفاده از آغازگرهای F2/R3 انجام گرفت، تنها در نمونه‌های کنترل مثبت (لارو ماهی grouper) یک باند ضعیف ۴۲۰ جفت بازی مشاهده شد، در حالیکه در هیچیک از نمونه‌های کفال ماهیان باند مزبور مشاهده نشد (شکل۳). مقایسه توالی نوکلئوتیدی منطقه T4 ژن پروتئین پوششی بتانوداویروس بدست آمده از کفال ماهیان دریای خزر با سایر ژنوتیپ‌های بتانوداویروس موجود در پایگاه NCBI نشان داد که این ویروس حداکثر شباهت را با ژنوتیپ RGNNV، با تشابه نوکلئوتیدی بالای ۹۵ درصد دارد.




**شکل ۲: محصول نهایی واکنش PCR در دور دوم؛ M: نشانگر مولکولی pb۱۰۰، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت (لارو ماهیgrouper)، چاهک ۳: نمونه های مغز کفال ماهیان آلوده**

**Figure 2: Final amplification of second PCR reaction; M: DNA ladder (100bp), Lane 1: Negative control, Lane 2: Positive control (grouper larva), Lane 3: Infected mullet brains.**




**شکل ۳: محصول نهایی واکنش PCR در دور اول؛ M: نشانگر مولکولی pb۱۰۰ ، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: نمونه های مغز کفال ماهیان آلوده، چاهک ۳: کنترل مثبت (لارو grouper).**

**Figure 3: Final amplification of first PCR reaction; M: DNA ladder (100bp), Lane 1: Negative control, Lane 2: Infected mullet brains, Lane 3: Positive control (grouper larva).**



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

## بحث

کفال ماهیان پس از ماهی سفید دومین رتبه را در میزان صید ماهیان استخوانی در سواحل ایرانی دریای خزر، دارند. با وجود این که این ماهیان بومی دریای خزر نیستند، ولی از میزان صید بالائی نسبت به ماهیان بومی همچون کپور، سوف و سیم برخوردارند (غنی‌نژاد، ۱۳۹۶). با این حال، در چند سال اخیر شاهد کاهش صید کفال ماهیان، در سواحل شمالی کشور هستید که عواملی چون بیماری نکروز عصبی کفال ماهیان، افزایش آلودگی‌های زیست محیطی، برداشت بیش از حد از ذخایر طی سال‌های گذشته، وجود شانه‌دار مهاجم به دریای خزر و تاثیرات مخرب آن بر اکوسیستم دریای خزر و نیز کاهش سطح آب دریای خزر در کاهش صید و ذخایر کفال ماهیان دخیل می‌باشند (فضلی و غنی‌نژاد، ۱۳۹۱).

بیماری نکروز عصبی ویروسی به عنوان یک بیماری نوظهور در پرورش ماهیان شناخته شده که متاسفانه هر ساله تعداد گونه‌های میزبان آن در گونه‌های آب شیرین و نیز آب شور در حال افزایش است (Binesh and Jithendran, 2013; Keawcharoen *et al*., 2015). بعلاوه، با افزایش تنوع در حوزه آبزی‌پروری ماهیان و انتقال ارگانیسم‌های زنده به منظور پرورش، بخصوص گسترش پرورش ماهیان در قفس احتمالاً سویه‌ها و ژنوتیپ‌های جدیدی در آینده بوجود می‌آیند. با توجه به ماهیت بسیار مخرب بتانوداویروس، جلوگیری از ورود ویروس به مزارع و هچری‌ها از طریق آزمایش غربالگری به منظور بررسی سلامت گله ماهیان و تشخیص سریع منبع ویروس در صورت شیوع بیماری، امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. در این میان بنظر می‌رسد روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR برای این منظور مفید باشند (Rajan, *et al*., 2016). بنابراین، روش‌هایی که از فناوری PCR استفاده می‌کنند مانند RT-PCR، Nested-PCR و Real- time PCR به علت سرعت، حساسیت و اعتبارشان اخیراً برای تشخیص بتانوداویروس‌ها بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند و بکار می‌روند (Thiery *et al*., 1999; Dalla Valle *et al*., 2000; Gomez *et al*., 2008; Jithendran *et al*., 2011; Rajan, *et al*., 2016).

در این تحقیق، برای افزایش حساسیت و بالا بردن اختصاصیت Nested RT-PCR، اقدام به بهینه سازی PCR شد. پارامترهای مهمی که در Nested برای بهینه سازی می‌توان در نظر گرفت، شامل دمای اتصال آغازگر با DNA الگو، تعداد سیکل‌های مورد استفاده در هر دو دوره و غلظت آغازگرها می‌باشد (Falahi *et al*., 2011; McPherson & Simon, 2006). در واقع، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به میزان زیادی به صحت اتصال آغازگر بر DNA الگو بستگی دارد. بهترین درجه حرارت برای انجام واکنش در محدوده‌ای قرار دارد که آغازگرها به طور کامل به توالی هدف متصل و از نواحی غیر اختصاصی جدا باشند. لذا، برای رسیدن به دمای Tm مناسب (دمای مناسب اتصال آغازگر به الگوی هدف) از دماهای پایین شروع و به طرف دماهای بالا با فاصله ۲-۱ درجه سانتی‌گراد آزمایش گردید. بعد از ارزیابی مقدارهای متفاوت cDNA و محصول PCR مرحله اول (۱، ۲، ۳، ۴) مقدار ۲ میکرولیتر به عنوان بهترین غلظت مورد گزینش قرار گرفت.

با توجه به اینکه هدف از این مطالعه راه‌اندازی و بکارگیری یک سیستم PCR قدرتمند برای تشخیص ناحیه T4 ویروس نکروز عصبی در کفال ماهیان است، می‌توان گفت که روش Nested RT- PCR راه‌اندازی شده، قادر به تشخیص ویروس در نمونه‌های مزمن کفال ماهیان دریای خزر است و نیز فاقد هر گونه باند غیر اختصاصی می‌باشد. اما روش RT-PCR (PCR مرحله اول) قادر به تشخیص ژنوم ویروس در هیچیک از نمونه‌های مشکوک کفال ماهیان نبود. بنابراین، با انجام دور دوم تکثیر با استفاده از اغازگرهای Nested (داخلی) حساسیت تشخیص به طور چشمگیری افزایش یافت.

Thiery و همکاران (۱۹۹۹) حساسیت این روش را با روش RT-PCR مورد مقایسه قرار دادند که نتایج حاصل از مطالعه آنها حساسیت بالاتر Nested RT-PCR را نسبت به روش RT-PCR نشان داد. بطوریکه این محققین تخمین زدند که سنجش Nested-PCR حداقل



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

۱۰۰ برابر حساسیت بیشتری از PCR یک مرحله‌ای دارد. بعلاوه، شکست روش RT-PCR برای ردیابی نکروز عصبی ویروسی جک راه راه (SJNNV) در *Pseudocaranx dentex* توسط Nishizawa و همکاران (۱۹۹۶)، گزارش شده است. Rajan و همکاران (۲۰۱۶) دو روش RT-PCR و Nested RT-PCR را برای ردیابی نکروز عصبی ویروسی در ماهیان Lates *calcarifer*، *Mugil cephalus* و *Liza parsia* مورد بررسی قرار دادند که در این بین *L. calcarifer* دارای علائم بالینی ویروسی در شرایط حاد بود، در حالیکه *M. cephalus* و *L. parsia* بدون هیچگونه علائم بالینی ظاهری و به صورت مزمن تنها حامل عامل بیماری بودند. در مطالعه مذکور روش RT-PCR قادر به تشخیص ویروس در نمونه ماهیان مزمن یا سوپرناتانت کشت‌های سلولی با تیتر ویروسی پایین ($10^3$ $TCID_{50}$/ml) نبود (Rajan *et al*., 2016). بنابراین، استفاده از RT-PCR احتمال ردیابی ویروس را در مغز و چشم ماهیان هنگامی که عوامل بیماری‌زا در سطوح بالاتر قرار دارند، امکان‌پذیر می‌سازد. در مقابل بنظر می‌رسد که Nested RT-PCR روشی مناسب برای تشخیص سطوح پایین آلودگی و همچنین یک روش تشخیصی سریع برای نمونه ماهیان وحشی آلوده به ویروس عامل بیماری بشمار می‌روند (Nishizawa *et al*., 1997).

در این بررسی با مقایسه توالی ناحیه T4 ژنوم جدایه‌های کفال ماهیان دریای خزر در پایگاه NCBI شباهت ۹۵٪ جدایه با گونه RGNNV آشکار شد. از ۴ ژنوتیپ بتانوداویروس بیشترین فراوانی مربوط به سویه RGNNV و کمترین پراکنش نیز مربوط به سویه SJNNV می‌باشد (Nishizawa *et al*. 1997; Skliris *et al*. 2001; Thiéry *et al*. 2004). به طور کلی، روش Nested RT-PCR که در این تحقیق استفاده گردید، روشی مؤثر، سریع و کاربردی در شناسایی بتانوداویروس‌ها بشمار می‌رود که امکان شناسایی بیماری نکروز عصبی ویروسی را با دو جفت آغازگر F2/R3 و NF2/NR3 فراهم می‌آورد. از مزایای مهم این روش حساسیت نسبتاً بالا و تشخیص سریع در مدت زمانی کوتاه است، بگونه‌ای که این روش می‌تواند روشی منتخب و مناسب برای شناسایی سطوح پایین نوداویروس‌ها و نیز جهت شناسائی سریع عامل بیماری در مورد ماهیان آلوده به ظاهر سالم[1] یا حاملین بدون علائم بیماری در نظر گرفته شود. این گونه ماهیان بیشترین نقش را در انتشار بیماری در مناطق جدید دارند و شناسائی آنها در برنامه‌های اپیدمیولوژیک دستگاه‌های متولی مبارزه با این بیماری، پایش و مراقبت[2] بسیار مهم و تعیین‌کننده می‌باشد (Zorriehzahra *et al*., 2016).

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای Dr. Chakravarthy Nallathambi از دپارتمان بیوتکنولوژی کالج مهندسی Rajalakshmi کشور هندوستان، و نیز خانم Dr. Anna Toffan از OIE Reference Laboratory for Viral Encephalopathy and Retinophathy (VER) انستیتو Istituto Veterinary presso Zooprofilattico Sperimentale در کشور ایتالیا، بخاطر همکاری صمیمانه در ارسال cDNA نمونه‌های کنترل مثبت این پژوهش تقدیر و تشکر نمائیم.

## منابع

**سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۵.** آمار رسمی سازمان شیلات ایران ، ۴۵ ص.

**غنی نژاد، د.، قانع، ا.، صیدگر، م.، اسدپور، ی. و اسماعیلی دهشت، ل.، ۱۳۹۶.** بررسی مقایسه ای تغذیه کفال ماهیان در سواحل ایرانی دریای خزر. نشریه فن آوری های نوین در توسعه آبزی پروری، ۲: ۵۰-۴۱.

**فضلی, ح, دریانبرد, غ.، ۱۳۹۱.** ارزیابی کیفی ذخایر کفال طلائی (*Liza aurata* Risso, 1810) در دریای خزر طی سالهای ۹۰-۱۳۷۰. شیلات, ۶۵(۳), ۳۰۷-۳۱۵. DOI: 10.22059/jfisheries.2012.29493

[1] Health apparently
[2] Monitoring and Surveillance



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

**Athanassopoulou, F., Billinis, C. and Prapas, T., 2004.** Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser sp*. Diseases of Aquatic Organisms, 60:247–52. DOI: 10.3354/dao060247.

**Azad, I.S., Shekar, M.S., Thirunavukkarasu, A.R., Poornima, M., Kailasan, M., Rajan, J.J.S., Ali, S.A., Abraham, M. and Ravichandran, P., 2005.** Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. Diseases of Aquatic Organisms, 63:113–118. DOI: 10.3354/dao063113.

**Bigarré, L., Cabon, J., Baud, M., Heimann, M., Body, A., Lieffrig, F. and Castric, J., 2009.** Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. Journal of Fish Diseases, 32: 667–73. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01037.x.

**Binesh, C.P. and Jithendran, K.P., 2013.** Genetic characterization of betanodavirus isolates from Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch) in India. Archives of Virology, 158:1543–7. DOI: 10.1007/s00705-012-1554-x.

**Crane, M. and Hyatt, A., 2011.** Viruses of fish: an overview of significant pathogens. Viruses, 3(11): 2025–2046. DOI: 10.3390/v3112025.

**Dalla Valle, L., Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P. and Colombo, L., 2000.** Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. Journal of Fish Diseases, 23: 321–327. DOI.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00255.x.

**Falahi, S.h., Ravanshad, M. and Kenar-koohi, A., 2011.** Application of new degenerate primer set for simultaneous isolation of hyper variable subunit of ENV gene from distinct HIV-1 genotypes. Arak Medical University Journal, 14(57): 60-68.

**Fukuda, Y., Nguyen, H.D., Furuhashi, M. and Nakai, T., 1996.** Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septem fasciatus*, associated with viral nervous necrosis. Fish Pathology, 31:165–70. DOI:10.3147/jsfp.31.165.

**Gomez, D.K., Baeck, G.W., Kim, J.H., Choresca Jr. K.H. and Park J. S.C., 2008.** Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. Veterinary Diagnostic Investigation, 20: 38–44. DOI: 10.1177/104063870802000107.

**Grotmol, S., Bergh, O. and Totland, G.K., 1999.** Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. Diseases of Aquatic Organisms, 36: 95–106. DOI: 10.3354/dao036095.

**Jithendran, K.P., Shekhar, M.S., Kannappan, S. and Azad, I.S., 2011.** Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India diagnostic



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

histopathology and nested RT-PCR. Asian Fisheries Science, 24:12–9.

**Keawcharoen, J., Techangamsuwan, S., Ponpornpisit, A., Lombardin,i ED., Patchimasiri, T. and Pirarat, N., 2015.** Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. Journal of Fish Diseases, 38:49–54. DOI: 10.1111/jfd.12200.

**McPherson, M. and Simon, M., 2006**. The basic PCR. Taylor and Francis, UK 292p.

**Moody, N.J.G. and Crane, M., 2014.** Betanodavirus Infections of Finfish, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure, CSIRO Australian Animal Health Laboratory, Australia, 25p.

**Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I., 1992.** Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. Virology, 187: 368–371. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90329-N.

**Munday, B.L., Kwang, J. and Moody, N., 2002.** Betanodavirus infections of teleost fish: a review. Journal of Fish Diseases, 25: 127–142. DOI:10.1046/j.1365-2761.2002.00350.x.

**Nazari, A., Hassan, M. D., Bovo, G., Zorriehzahra, M. J., Azmi,T. I. and Arshad, S.S., 2014.** Pathogenicity of viral nervous necrosis virus for Guppy fish, *Poecilia reticulate*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13(1):168-17.

**Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K., 1997.** Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1633–1636.

**Nishizawa, T., Muroga, K. and Arimoto, M., 1996.** Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. Journal of Aquatic Animal Health, 8: 332–334. DOI: 10.1577/1548-8667.

**Office Internationales Epizooties (OIE), 2013.** Chapter 2.3.11, viral encephalopathy and retinopathy. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal. Office International des Epizooties (OIE), Paris, France p. 123.

**Rajan, J.S.J., Ezhil Praveena, P., Bhuvaneswari, T. and Jithendran, K.P., 2016.** Design and evaluation of reverse transcription nested PCR primers for the detection of betanodavirus in finfish. Virus Disease, 27(2):123-9. DOI 10.1007/s13337-016-0313-0.

**Sahoo, P.K. and Goodwin, A.E., 2012.** Viruses of freshwater finfish in the Asian-Pacific region. Indian Journal of Virology, 23(2): 99– 105. DOI: 10.1007/s13337-012-0102-3.

**Samuelsen, O.B., Nerland, A.H., Jorgensen, T., Schroder, M.B., Svasand, T. and Bergh, O., 2006.** Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. Diseases of Aquatic Organisms, 71:239–54.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

**Shetty, M., Maiti, B., Santhosh, K.S., Venugopal, M.N. and Karunasagar, I., 2012.** Betanodavirus of Marine and Freshwater Fish: Distribution, Genomic Organization, Diagnosis and Control Measures. Indian Journal of Virology, 23(2):114–123. DOI 10.1007/s13337-012-0088-x.

**Skliris, G.P., Krondiris, J.V., Sideris, D.C., Shinn, A.P., Starkey, W.G. and Richards, R.H., 2001.** Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. Virus Research, 75: 59-67. DOI: 10.1016/S0168-1702(01)00225-8.

**Tanaka, S., Aoki, H. and Nakai, T., 1998.** Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septem fasciatus*. Fish Pathology, 33: 31–36. DOI: /10.3147/jsfp.33.31.

**Thiéry, R., Raimond, J.C. and Castric J., 1999.** Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Virus Research, 63:11–17.DOI.org/10.1016/S0168-1702(99)00053-2

**Thiery, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Kerbart-Boscher, S and Nevarez, L., 2004.** Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host fish species specificity. Journal of General Virology, 85:3079-3087.

**Thiéry, R., Johnson, K.L., Nakai, T., Schneemann, A., Bonami, J.R. and Lightner, D.V., 2011.** Family Nodaviridae. *In:* Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. and Lefkowitz E.J., (eds.) Elsevier Academic Press, London, UK. 1061–1067.

**Zorriehzahra, M. J., Nakai, T., Sharifpour, I., Gomez, D. K., Shau-Chi, C., Soltani, M. and Saidi, A. A., 2005.** Mortality of wild golden grey mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea associated with viral nervous necrosis-Like agent. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 4(2): 43-58.

**Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, m., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, S., Nazari, A., Sharifpour, I.and Rohani, M.S., 2013.** Study of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Caspian Sea grey mullet *Liza auratus* and the evaluation of its infection and a transition probability to other fish (sturgeon, *Rutilus frisi* and cultural fish) in Iran. Final report of a national research project, Iranian Fisheries Research Organization (IFRO). 186p.

**Zorriehzahra, M. E. J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, S. H., Bovo, G., Nazari, A. and Dhama, K., 2016.** Isolation and confirmation of viral nervous necrosis (VNN) disease in golden grey mullet (*Liza aurata*) and leaping mullet (*Liza saliens*) in the Iranian waters of the Caspian Sea. Veterinary Microbiology, 190: 27-37. DOI:10.1016/j.vetmic.2016.04.023



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

# The introduce of a new modified Nested RT-PCR molecular technique for rapid diagnosis of Viral Nervous Necrosis (VNN)

Hassantabar F.[1]; Firouzbakhsh F.[1]; Zorriehzahra M.J.[2*]; Thompson K.D.[3]

[*]zorrieh@yahoo.com

1-Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Islamic Republic of Iran
2-Aquatic Animal Health and Diseases Dept., Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3-Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan Penicuik, Midlothian EH26 0PZ, UK

[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-05 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.8.2 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118421 ]

## Abstract

Viral Nervous Necrosis (VNN) is considered as one of the most important threats for mariculture and aquaculture in the world and up to now, it has been affecting more than 70 fish species. This study was aimed to detect and identify fish betanodavirus, the causative agent of VNN, using nested RT-PCR from brain tissue of Caspian Sea Mullet. Forty samples of subclinical golden grey mullet fish (range: 50-250 gr) were collected from the coastal areas of Caspian Sea in 2016. The target organ (brain) was excised and the reverse transcription (cDNA synthesis) was carried out followed by the RNA extraction. In the present study, detecting of the virus was performed with Nested RT-PCR using two pairs of primers F2/R3 and NF2/NR3 in two steps. After optimization of PCR, all of the forty specimens were negative by the first-step PCR (RT-PCR) while 20 out of 40 grey mullet were positive using Nested RT-PCR (second-step PCR) and a strong band of the expected size (300 bp) was clearly observed. Therefore, it seems that Nested RT-PCR is a method of choice for rapid detection of the low level of infection and in asymptomatic carrier fish. In addition, the result of sequencing revealed that the virus belonged to the RGNNV genotype.

**Keywords:** Viral Nervous Necrosis, Golden grey mullet, Nested RT-PCR, Sequencing

[*]Corresponding author