

مقاله علمی-پژوهشی:

استفاده از روش Real-Time PCR به منظور شناسایی بیماری‌های ویروسی اخطار کردنی (VHS, IPN 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^۴، شاپور کاکولکی^۱، محمدرضا مهربابی^۱، علیرضا شناور ماسوله^۲، مریم قیاسی^۵

*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
- ۴- پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران
- ۵- 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، IHN، VHS

*نویسنده مسئول

مقدمه

تقاضای رو به رشد جهانی برای غذاهای دریایی همچنین ظرفیت محدود بخش صیادی برای برآوردن این تقاضا موجب شد، صنعت آبی 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 آبی‌پروری وجود ندارد (نفیسی، ۱۳۸۹). سه بیماری ویروسی نکروز عفونی بافت خونساز (IHN)^۱، سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی (VHS)^۲ و نکروز عفونی پانکراتیک (IPN)^۳ از جمله بیماری‌های ویروسی بشدت مسری در مزارع پرورشی دنیا به عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات در صنعت آبی‌پروری آزاد ماهیان معرفی شده است (نفیسی، ۱۳۸۹). بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بیماری‌های واگیردام (OIE)^۴ روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های مذکور شامل کشت سلولی، RT-PCR^۵، IFAT^۶، NT^۷، ELISA یا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Real-Time پیشنهاد شده است (OIE, 2016).

شاید اولین گزارشی که در آن بتوان به شناسایی ردپای بیماری‌های ویروسی اخطار کردنی^۷ در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در کشور اشاره نمود، گزارش ذریه‌زها و همکاران (۱۳۸۴) باشد. آنها در این مطالعه به بررسی علل احتمالی سندرم تلفات نوزادان و ماهیان جوان قزل‌آلای 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

IPN، IHN 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 قزل‌آلای 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 تک‌ رشته‌ای و شامل یک رشته غیرکد دهنده RNA با اندازه تقریبی ۱۱۰۱ کیلوباز است. در ژنوم ویروس IHN، شش ژن شامل: nucleocapsid (N)، phosphoprotein (P)، Virus polymerase (L) وجود دارد. در میان ژن‌های IHN، ژن N 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 ۹-۱۰ 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

مناسب تشخیصی جهت شناسایی سروتیپ های مختلف ویروس باشد.

در حال حاضر، استفاده از روش Real-time PCR جهت تشخیص سریع و دقیق بیماری های ویروسی آبیان به طور گسترده ای 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 روش های مختلفی برای شناسایی ویروس های قزل آلائی رنگین کمان استفاده می شود. با توجه به اطلاعات موجود و گزارش سه ویروس IHN، VHS و IPN به عنوان عوامل بیماری زا در کشور، نیاز به دسترسی به اطلاعات در مورد روش های تشخیصی سریع و دقیق، پراکنش ویروس و انواع گروه های ژنی^۱ موجود در کشور وجود دارد. به طور متداول، روش پیشنهادی برای تشخیص بیماری های 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. روش های مورد استفاده به رغم دقت بالا، بسیار وقت گیر و پرهزینه می باشند و علاوه بر آن نیاز به آزمایشگاه های تخصصی می باشد. به رغم گسترش استفاده از روش های 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 قزل آلائی پرورشی شامل IPN، IHN و VHS صورت گرفت که در ایران علت عمده مرگ و میر ماهیان قزل آلائی پرورشی در سال های اخیر بشمار می روند و در چندین کارگاه در استان های کهگیلویه 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 بیماری های ویروسی می باشد، استفاده از روش Real-Time PCR کمک بسیار مهمی در کنترل و پیشگیری از بیماری های ویروسی قزل آلائی رنگین کمان در کشور خواهد نمود.

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

ویروس VHS، از بیماری های ویروسی مهلک در آزادماهیان (قزل آلا) است و یک ویروس تک رشته ایی متعلق به جنس *Novirhabdovirus* از خانواده رابدوویروس (Rhabdoviridae) می باشد (Dietzgen and Kuzmin, 2012). ژنوم VHS شامل تقریباً ۱۱ کیلو باز و ۶ ژن کد کننده از جمله Nucleocapsid (N)، فسفو (P)، ماتریکس (M)، گلیکو (G)، غیرساختاری (NV) و پروتئین RNA پلیمرز (L) است. بر اساس آنالیز فیلوژنی ژن های پروتئین N، P، G و NV، ایزوله های ویروس VHS به ۴ ژنوتایپ متفاوت شامل ژنوتایپ های I، II، III و IV تقسیم بندی می شوند (Snow *et al.*, 2005; Einer-Jensen *et al.*, 2004). این بیماری سبب تلفات بالا در مزارع پرورش قزل آلا می شود 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 بیماری های واگیر دام (OIE) گزارش نمود. در سال ۱۳۹۲ وقوع همه گیری های شدید از این بیماری در استان های مختلف کشور گزارش شد که موجب خسارات اقتصادی بسیار در میان مزارع سردابی کشور گردید (بکایی و همکاران، ۱۳۹۶).

ویروس IPN در آزادماهیان سبب تلفات شدیدی در بچه ماهیان با سن زیر ۶ ماه و نیز ماهیان بالغ می گردد. عامل ایجاد این بیماری یک ویروس ۲ رشته ای بدون پوشش از خانواده *Birnaviridae* جنس *Aquabirnavirus* دارای قطر تقریبی ۶۰ نانومتر می باشد. ژنوم این ویروس دارای ۲ قطعه RNA دو رشته ایی است. قطعه A، که پروتئین ویروسی کپسید را کد می کند (VP2)، پروتئین داخلی (VP3)، یک پروتئاز ویروسی (VP4)، و یک پروتئین غیرساختاری (VP5) و قطعه B که RNA پلیمرز را کدگذاری می کند (Dobos, 1995). مولدین ناقل دارای سطوح متفاوت بیماری زایی در مواد تناسلی تخمک و اسپرم می باشد بطوریکه انتقال عمودی این ویروس بر خلاف ضد عفونی گسترده در سطح تخم ها مشاهده شده است. جهت جلوگیری از انتقال عمودی ویروس IPN، مواد تناسلی مولدین مشکوک به بیماری مورد آزمایش قرار می گیرد. از آنجایی که تعداد ویروس IPN در بافت های آلوده به ویروس پایین است، استفاده از روش های حساس کاربردی مورد نیاز است (Tapia *et al.*, 2017). بعلاوه، شناسایی IPN باید بر اساس روش های

¹ Genogroups

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 تجمع 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 تجمع شده از بافت‌های 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 آبی‌پروری 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 <i>et al.</i> , 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	TCCAACCTACGAGCTGATCCC 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 <i>et al.</i> , 2008
IHN-N441R	TGTGGCCATCTTGTCCACATC	
IHN-G296F	TCCACAAAGTCTGTACCGCA	
IHN-G409R	TGTCATACGCCCTGCTTCTT	
IHN-N737F	TGTGCATGAAGTCAGTGGTGG	
IHN-N843R	CCTGCTCATCATGACACCGTA	
IHN-G1035F	CGCTATGCACAAAGGCTCCAT	
IHN-G1147R	ATTCCTGTAAGCTGGTAGCGC	

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 Opticon Monitor 3.0 (Bio-Rad, USA) 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 تعیین دمای مناسب اتصال پرایمر^۱ و تکثیر هر آغازگر، و با استفاده دو نمونه cDNA 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 $1-\alpha$ elongation factor (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 $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ و با استفاده از شیب منحنی استاندارد محاسبه شد. راندمان تکثیر (E) معمولاً به درصد بیان می‌شود، برای تبدیل E به درصد از فرمول: $\% \text{Efficiency} = (E-1) \times 100$ 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، ۱:۲۵، 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 مرحله‌ای 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 دستورالعمل 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 2^{-Ct} ، تعداد چرخه‌هایی است که در آن میزان نور فلورسنت واکنش تکثیر برای اولین بار نسبت 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 $1-\alpha$ elongation factor (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 BIOZOI، 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 ۱/۸ - ۲/۱ 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 $1-\alpha$ elongation factor (EF-1- α)، بر اساس توالی‌های

² Threshold cycle

¹ Annealing

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 ($R^2 \leq 100$ درصد) محاسبه شد. در کنترل‌های منفی واکنش که شامل نمونه‌های فاقد cDNA و نمونه‌های cDNA فاقد آنزیم Reverse transcriptase بود، هیچ سیگنالی مشاهده نشد، عدم مشاهده سیگنال در نمونه‌های cDNA فاقد 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 آغازگر β -actin دارای مقدار R2 (شاخص تکرارپذیری) 0.999 ($R^2=0.999$) و شیب خط $3/59$ - 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، 75 درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. همچنین نتایج تکثیر cDNA نمونه‌های آزمایشی با استفاده از آغازگر ژن رفرنس EF-1- α نیز نتایج مثبتی که مبتنی بر کیفیت مناسب نمونه‌های آزمایشی بود را مشخص نمود. و دمای ذوب آغازگر در مورد آغازگر EF-1- α ، دمای $78/5$ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید.

ارزیابی روش Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین

در سه بیماری IPN, IHN, VHS

رقت‌های سریالی با نسبت $1:10$ از cDNA ویروس‌های IPN, IHN, VHS تهیه و برای هر رقت با استفاده از 2 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) 0.975 و شیب خط $2/06$ -،

بیماری ویروس IHN دارای شاخص تکرارپذیری (R^2) 0.971 و 0.948 و شیب خط $3/16$ - و $3/22$ - و بیماری ویروس IPN دارای شاخص تکرارپذیری (R^2) 0.967 و 0.957 و شیب خط $3/284$ - و $3/337$ - بود. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص شد، حداقل رقت (0/1) در cDNA، برای شناسایی ویروس مورد نیاز است.

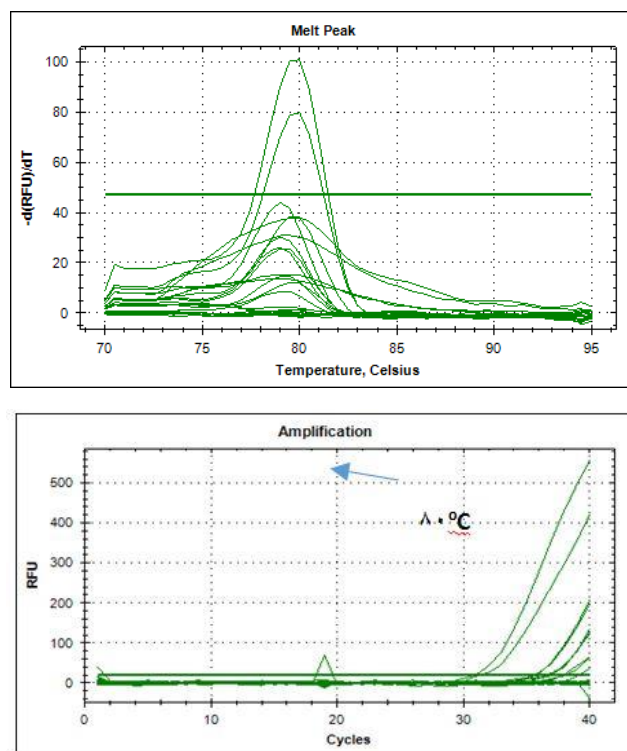
آزمایش‌های Real-Time PCR یک مرحله‌ای

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 مرحله‌ای 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 (Qia-Gen Germany) Quanti Nova SYBR Green مشخص نمود که نمونه‌های مربوط به کارگاه‌های تکثیر و پرورش منتخب استان‌های مازندران، کهگیلویه و بویر احمد و آذربایجان غربی آلوده به ویروس VHS می‌باشند (شکل ۱).

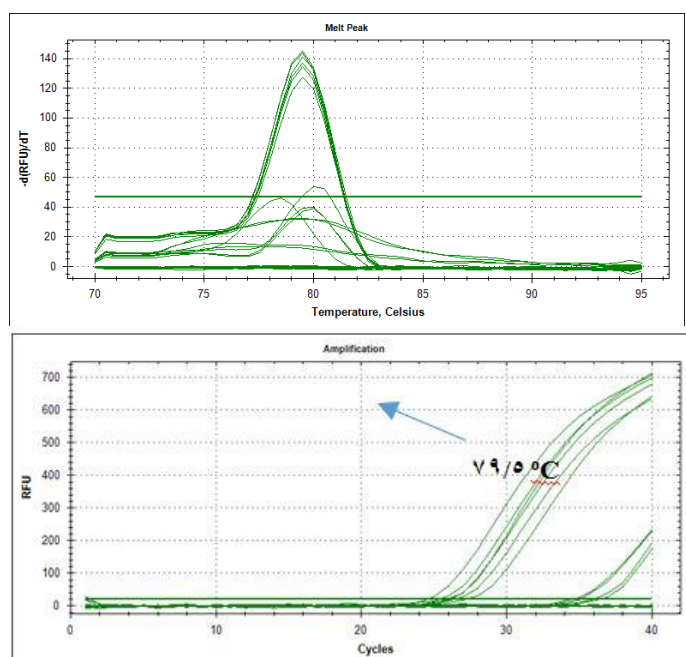
نتیجه تکثیر Real-Time PCR در نمونه‌های فوق با استفاده از آغازگر انتخاب شده برای ویروس IPN، تکثیری نداشت و بنظر می‌رسد که این بیماری در مزارع منتخب وجود نداشت. همچنین تکثیر نمونه‌های آزمایشی از مزارع منتخب پرورش قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از آغازگر بیماری ویروسی IHN، وجود ویروس بیماری‌زا را در برخی 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 ویروسی VHS، 80 درجه سانتی‌گراد و در در بیماری ویروسی IHN، $79/5$ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (شکل ۳).

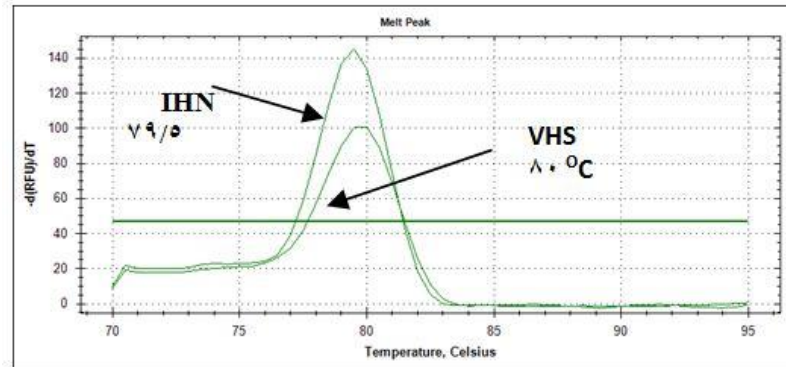
¹ Efficiency



شکل ۱: نتایج تکثیر نمونه‌های RNA تخلیص شده از ماهیان مزارع مختلف با استفاده از آغازگر بیماری ویروسی VHS و کیت 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 Kit



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

روش های مولکولی به دلیل حساسیت بالا و سرعت عمل بمراتب از روش کشت سلولی کاربردی تر بنظر می رسد، هنگامی که تعداد زیادی نمونه تحت آزمایش قرار می گیرند یا در مورد آلودگی توأمان، روش های مولکولی از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به کشت سلولی برخوردار می شوند. تنها عیب روش های مولکولی هزینه بالای انجام آنهاست که حساسیت و سرعت عمل این جنبه منفی را می پوشاند. در صورتیکه استفاده از روش های مولکولی مورد تایید قرار بگیرد، هزینه انجام آن در گروه های ۱۵-۱۰ تایی کاهش خواهد یافت. با این وجود به دلیل عدم قطعیت کامل در استفاده از روش های مولکولی، استفاده از کشت سلولی هنوز هم به عنوان آزمون طلایی در تشخیص بیماری های ویروسی مورد تایید سازمان جهانی بیماری های واگیردام (OIE) می باشد.

پیشرفت های اخیر در شناسایی بیماری های عفونی در انسان، گیاه و گونه های کشاورزی بتدریج در مدیریت بهداشتی گونه های مهم آبزیان مورد استفاده قرار گرفت. برای مثال، استفاده از روش Real-time PCR در مطالعات بیان ژن و شناسایی بیماری های ویروسی در ماهیان و سخت پوستان را می توان 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). 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، رنگ های

روش های تشخیص مولکولی امکان شناسایی زودهنگام و جلوگیری از انتشار عوامل بیماری زای مهم را فراهم نموده است که این امر در نتیجه سرعت، حساسیت و دقت بالای آزمایش های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز می باشد (Park *et al.*, 2011). آزمایشگاه های تشخیص بیماری های ویروسی، وابسته به استفاده از روش های تشخیص سریع، حساس و دقیق با قابلیت کاربری آسان و هزینه اقتصادی می باشند (Pierce *et al.*, 2013). آزمون استاندارد غربالگری در مورد رابدوویروس ها و بیروویروس ها در آبزیان، کشت سلولی بوده که متعاقب آن از روش های سرمی مانند FAT یا مولکولی مانند PCR استفاده می شود (OIE, 2016). روش استفاده از کشت سلولی، روش مورد تایید سازمان جهانی بیماری های واگیردار می باشد که بهینه سازی آزمایشگاهی این روش نزدیک به ۱ ماه بطول می انجامد و در بعضی موارد نتیجه نادرست می دهد (Chico *et al.*, 2006; Lopez-Vazquez *et al.*, 2006, 2015; Jonstrup *et al.*, 2011). در مقایسه با روش های سنتی کشت سلولی، همه روش های مبتنی بر آزمایش های PCR، دارای توانایی بالایی در تشخیص بیماری های ویروسی می باشند (Hope *et al.*, 2010). انجام کشت سلولی و جداسازی ویروس های آبزیان در کشور به شکل بسیار محدود در مراکز تشخیص سازمان دامپزشکی و آزمایشگاه های تحقیقاتی کشور انجام می گیرد. بکارگیری آزمون یا آزمون هایی مناسب که سرعت عمل بالا و حساسیت مورد قبولی داشته باشند، بسیار ضروری بنظر می رسد.

Real-time PCR 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 قزل‌آلای رنگین کمان باشد. در دستورالعمل OIE (۲۰۱۶) استفاده از روش تکثیر نسخه‌بردار معکوس^۲ 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

فلورسنت متعددی جهت تشخیص محصول Real-time PCR در دسترس قرار دارد. این مواد شامل رنگ سایبر گرین متصل شونده به DNA غیراختصاصی، الیگوپروپ‌های خطی نشاندار شده با فلورسنت، الیگو پروپ‌های نوکلئاز-۵'، و بیوکون‌های مولکولی می‌باشد (Mackay et al., 2002). در بین رنگ‌های فلورسنت، سایبرگرین روش ساده و کم هزینه‌تری می‌باشد و نیاز به طراحی الیگوپروپ‌های نشاندار ندارد. همچنین اختصاصی بودن محصول تکثیر شده نیز با بررسی نمودار نقطه ذوب^۱ 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, Ørpetveit et al., 2010; 2008). بطوریکه روش‌های ارائه شده دارای قابلیت استفاده به عنوان ابزار کاربردی در مدیریت بیماری‌های ویروسی در هجری‌های 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

² Reverse Transcriptase¹ Melt curve

ستاری، م. و روستایی، م.، ۱۳۷۸. بهداشت ماهی ۱. انتشارات دانشگاه گیلان. ۲۸۴ ص.
نفیسی بهابادی، م.، ۱۳۸۹. راهنمای عملی پرورش ماهی قزل آلی 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.

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^۱ سازمان‌های 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 سیتیسمی خونریزی‌دهنده ویروسی (Viral Hemorrhagic Septicemia) و عوامل مؤثر بر آن در مزرعه‌های ماهی قزل‌آلی کشور در سال ۱۳۹۳: یک مطالعه مقطعی. مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران. دوره ۱۳. شماره ۳. ۲۵۳-۲۶۱.

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

¹ Monitoring and Surveillance

- 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
- Dietzen, 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., Grocock, 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

- North America. *Journal of General Virology*, 84(4), 803-814. DOI:10.1099/vir.0.18771-0
- López-Vázquez, C., Dopazo, C.P., Oliveira, 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
- Nieters, 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*

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

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