یافته علمی کوتاه:

مطالعه بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی (VHS) در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به روش مولکولی (Multiple RT-PCR) در استان چهارمحال و بختیاری (سال ۱۳۹۴)

هاجر بنده خدا[۱]، اسماعیل پیرعلی‌خیرآبادی*[۱]، آزاده نیازی[۲]

*esmaeil_pirali@yahoo.com

۱- گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱٤۰۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱٤۰۱

لغات کلیدی: بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی (VHS)، چهارمحال و بختیاری، قزل‌آلای رنگین‌کمان، RT-PCR

مقدمه

عامل بیماری سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی(VHS)، یک ویروس RNA دار از جنس *Novirhabdovirus* و متعلق به خانوادهRhabdovirus است (Dietzgen and Kuzmin, 2012). VHSیکی از بیماری‌های مهم واگیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سراسر دنیاست که جزو بیماری‌های اخطار کردنی سازمان جهانی بیماری‌های واگیر دام قرار دارد (OIE, 2016). این بیماری ابتدا در بیش از ۸۰ گونه از ماهیان آب شیرین و شور در سراسر نیم‌کره شمالی شامل آمریکای شمالی، اروپا و آسیا جدا شده است (Skall *et al.*, 2005). انواع ژنوتیپ I تا IV که هر یک شامل Sub type های دیگری است و غالباً ژنوتیپ‌های I و II و III محدود به اروپا و ژنوتیپ IV در سراسر اقیانوس آرام و آمریکای شمالی شناسایی شده‌اند (Olesen and Skall, 2013).

Guðmundsdóttir و همکاران (۲۰۱۹) موفق به شناسایی یک سویه جدید درماهیان وحشی اطراف مزارع ایسلند شدند. آنالیز فیلوژنی ویروس نشان داد که سویه جدید احتمالاً متعلق به ژنوتیپ IV بیماری است و این اولین گزارش جداسازی زیر گروهIV درمزارع پرورش ماهی ایسلند و کشورهای اروپایی است (Yusuff *et al.*, 2019). درمطالعه‌ای با بررسی کامل توالی VHS، نشان دادند که توالی ژنوتیپ Ia ویروس بیشتر در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کشورهای اروپایی و ژنوتیپ IVb ویروس در مناطق آبی ایالات متحده آمریکا وجود دارد. توالی کامل ویروس Ia شناسایی و در بانک ژن با شماره دسترسی KC778774 قرار داده شد و توالی نوکلیوتیدی آن ۱۳٪ متفاوت از سویه‌های آمریکایی است. نتایج مطالعه انجام شده در شش استان پر تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور نشان داد، خاستگاه این بیماری ویروسی ایجاد شده در اروپاست (Ahmadivand *et al.*, 2016).

بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بیماری‌های واگیر دام، روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های مذکور شامل

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.4.9.7]

کشت سلول، RT-PCR، IFAT، ELISA یا Real-Tim PCR پیشنهاد شده است (OIE, 2016). این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۸۴ شناسایی و گزارش گردید (ذریه‌زهرا و همکاران، ۱۳۸۴). این مطالعه با هدف شناسایی و جداسازی دقیق عوامل بیماری‌زا به صورت هم‌زمان و به روش Multiple Real-time PCR به منظورشناسایی کانون‌های آلوده و ردیابی علل شیوع بیماری جهت کنترل به موقع انجام گردید.

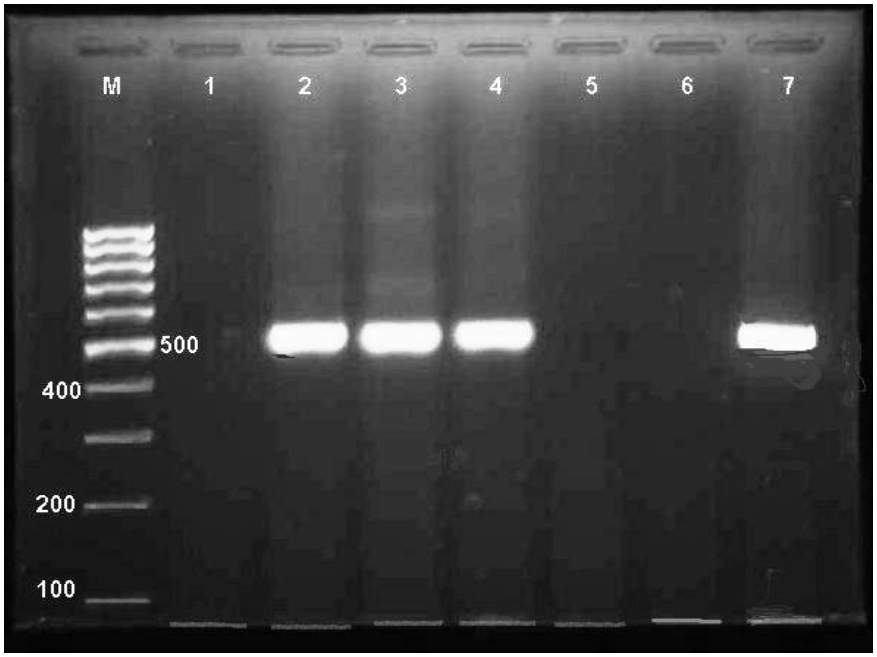
مواد و روش کار

دراین مطالعه، تعداد ۱۶۹ نمونه ماهی با علائم بالینی از مراکز تکثیر و پرورش به آزمایشگاه مرکز تشخیص اداره کل دامپزشکی استان به منظور تست RT-PCR ارسال و نمونه هموژن تهیه گردید. جهت استخراج RNA ویروسی از KitRNeasy Mini شرکت QIAGEN با کد ۷۴۱۰۴ ساخت کشور آلمان و بر اساس راهنمای شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت (Adams *et al*., 1994). RNA به‌دست آمده تا زمان آزمایش RT-PCR در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

با توجه به احتمال بروز هم‌زمان عفونت‌های ناشی از ویروس‌های مذکور در مزارع و تشابه علائم بالینی همچنین تلفات در لاروها و ماهیان پروارى (Montero *et al*., 2011)، علاوه بر شناسایی ویروس VHS جهت تشخیص جداگانه ویروس‌های IPN **و** IHN از یک جفت پرایمر اختصاصی طبق دستور شرکت سیناژن استفاده شد**.** مخلوط واکنش RT-PCR با استفاده از KitRT-PCR One Step شرکت آلمانی QIAGEN آماده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از RT-PCR روی نمونه‌های مورد آزمایش منجر به شناسایی تعداد ۲۰ نمونه ویروس VHS با تولید قطعه ژنی با وزن مولکولی ۵۰۴ bp شد(شکل ۱). همچنین تعداد ۴۲ نمونه IPN مثبت با وزن مولکولی ۲۰۰ bp (جفت باز) و ۲۸ نمونه IHN مثبت با وزن مولکولی ۳۷۱bp شناسایی و جداسازی گردید. در پایان با استفاده از نرم‌افزار Office Excel 2013 فراوانی نسبی هر سه بیماری در مزارع پرورشی مورد مطالعه محاسبه و نمودار درصد فراوانی بیماری‌ها تهیه گردید (شکل ۲).

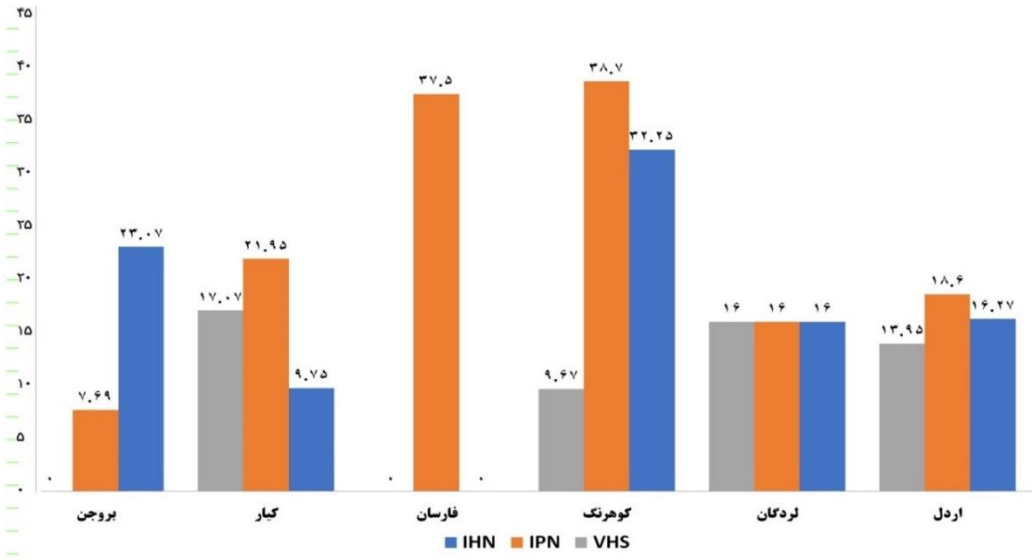


شکل ۱: ژل آگارز ۲ درصد محصول RT-PCR برخی جدایه‌های ویروس VHS مورد مطالعه. M = مارکر bp ۱۰۰، ۷ = کنترل مثبت،۵ و ۶ کنترل منفی، ۲، ۳ و ۴ جدایه‌های ویروس VHS

Figure 1: Agarose Gel 2% RT-PCR some of VHS virus isolates M = 100bp7= positive control, 5 and 6 negative control, 2,3 and 4 VHS viral isolates

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.4.9.7]



شکل ۲: نمودار درصد فراوانی بیماری‌هایIPN,IHN و VHS در شهرستان‌های مورد مطالعه استان

Figure 2: Graph of the frequency of IPN, IHN and VHS diseases in the studied cities of the province

بیماری سپتی‌سمی‌خونریزی‌دهنده ویروسی (VHS) با عامل رابدوویروس موجب تلفات بالا در آزاد ماهیان مانند آزاد ماهیان پرورشی اقیانوس آرام گردید Hope *et al.*, (2010). ویروس VHS در اکثر مناطق اروپا به صورت بومی درآمده و از جدی ترین بیماری‌های عامل خسارت در این کشورها بوده است (Hill, 1992).

Williams و همکاران (۱۹۹۹) سه ویروس IPN، IHN و VHS را با انجام تست Multiplex Reverse Transcriptase – PCR به طور هم‌زمان بررسی کردند که نتایج نشان داد، میزان حساسیت این تست برای سه ویروس به‌ترتیب با ۲۵، ۳۲/۵ و ۱۰۰ درصد دز عفونی کشت بافت در هر میلی‌لیتر مربوط به تلفات مشکوک به بیماری‌های ویروسی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. ذریه‌زهرا و همکاران (۱۳۸۴) در بررسی علل احتمالی سندرم تلفات نوزادان قزل‌آلای رنگین‌کمان در شش استان کشور با روش‌های گوناگون تشخیصی مورد تایید OIE (۲۰۱۶) موفق شدند، پادتن‌های ویروس IHN، IPN و VHS را در مولدین و بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان شناسایی و ردیابی کنند. نتایج مطالعه با تأیید مطالعات قبلی نشان داد، در مزارع تکثیر و پرورش مورد مطالعه فراوانی نسبی بیماری VHS، ۱۱/۸۳ درصد و در بیماری‌های IPN و IHN به‌ترتیب ۲۴/۸۵ و ۱۶/۵۶ می‌باشد. بیشترین فراوانی نسبی بیماری VHS مربوط به شهرستان کیار با ۱۷/۰۷ درصد، بیشترین فراوانی نسبی بیماری IPN مربوط به شهرستان کوهرنگ با ۳۸/۷ درصد و بیشترین فراوانی نسبی بیماری IHN مربوط به شهرستان کوهرنگ با ۳۲/۲۵ درصد بوده است. مقایسه منابع آبی مختلف در استان نشان داد، فراوانی نسبی بیماری VHS در نمونه‌های منابع آب رودخانه‌ها نسبت به سایر منابع بیشتر است. بدین‌ترتیب، نتایج بیانگر نقش عمده کیفیت آب و استفاده از پسآب مزارع بالادست در انتقال ویروس و سرایت بیماری بوده است.

منابع

ذریه‌زهرا، ج.، سلطانی، م.، سعیدی، ع. و مهرابی، م.، ۱۳۸۴. بررسی مقدماتی امکان ردیابی علل عفونی (ویروسی، باکتریایی) سندروم تلفات نوزادان و ماهیان جوان قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، گزارش نهایی شماره ۸۴/۴۷۰، صفحه۲۹۱.

Adams, A., Marin, M. and Maho, D.E., 1994. Immunohistochemical detection of pathogens. *fish Immunology*, pp 133-144.

Ahmadivand, S., Soltani, M., Mardani, K., Shokrpoor, S., Rahmati-Holasoo, H., Mokhtari, A. and Hasanzadeh, R., 2016.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.4.9.7]

Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Tropica*, 156: 30-36. Doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.005.

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.
Doi: https://doi.org/10.21775/9781912530069

Guðmundsdóttir, S., Vendramin, N., Cuenca, A., Sigurðardóttir, H., Kristmundsson, A., Iburg, T. M. and Olesen, N.J., 2019. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *Journal of Fish Diseases*, 42(1): 47-62. Doi: 10.1111/jfd.12910.

Hill, B.J., 1992. Impact of viral diseases of salmonid fish in the European Community, In *Salmonid* diseases. Paper presented at the *OJI International Symposium on Salmonid Diseases*, Hokkaido University Press, Sapporo, Japan (pp. 48-59).

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: 10.1577/H09-028.1.

Montero, J., Garcia, J., Ordas, M.C., Casanova, I., Gonzalez, A., Villena, A., Coll, J. and Tafalla, C., 2011. Specific regulation of the chemokine response to *viral hemorrhagic septicemia virus* at the entry site. *Journal of Virological Methods*, 85: 4046-4056. Doi: 10.1128/JVI.02519-10.

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 .

Olesen, N.J. and Skall, H.F., 2013. Viral haemorrhagic septicaemia virus. *Mononegaviruses of Veterinary Importance*, I, pp. 323–336.

Skall, H.F., Olesen, N.J. and Mellergaard, S., 2005. Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming–a review. *Journal of Fish Diseases*, 28(9): 509-529. Doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x.

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. Doi: 10.1128/JCM.37.12.4139-4141.1999.

Yusuff, S., Kurath, G., Kim, M.S., Tesfaye, T.M., Li, J., McKenney, D.G. and Vakharia, V.N., 2019. The glycoprotein, non-virion protein, and polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus are not determinants of host-specific virulence in rainbow trout. *Virology Journal*, 16(1): 1-16. Doi: 10.1186/s12985-019-1139-3.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.4.9.7]

Study of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) disease distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms using RT-PCR in Chaharmahal va Bakhteiari Province (2013)

Bandeh Khoda H.[1]; Pirali Kheirabadi E.[1]*; Neiazi A.[2]

*esmaeil_pirali@yahoo.com

1-Department of Fisheries Science, Faculty of Natural Resources. Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2-Department of Fisheries Science, Faculty of Agriculture, Tehran Science and Research, Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Distribution of hemorrhagic septicemia (VHS) by molecular method (RT-PCR) in rainbow trout breeding centers in Chaharmahal and Bakhtiari province were studied in 2015. As for the possibility of synchronously involvement of farms with viral diseases of hematopoietic necrosis (IHN), pancreatic necrosis (IPN) and hemorrhagic septicemia (VHS) with similar clinical symptoms, from 169 trout breeding centers ¬ Rainbow disease and high mortality were sampled. The results showed that the relative frequency of disease (VHS) was 11.83%, of which Kiar city with 17.7% had the highest and Koohrang city with 9.67% had the lowest infection. The average prevalence of disease (IPN) was 24.85% and disease (IHN) was 16.56. Also, the prevalence of diseases (VHS) and (IHN) in river water sources was higher than in other water sources.

Keywords: Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS), Chaharmahal va Bakhtiari, Rainbow trout, RT-PCR

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.4.9.7]