مقاله علمی – پژوهشی:

بررسی مولکولی کوی هرپس ویروس (Koi Herpesvirus) در تلفات مزارع پرورشی ماهیان گرمابی استان خوزستان

صفیه شهوازی[۱]، آناهیتا رضایی*[۱]، مسعود رضا صیفی آباد شاپوری[۱]، مجتبی علیشاهی[۲]، مینا آهنگرزاده[۳]

*a.rezaie@scu.ac.ir; pathrezaie@gmail.com

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

هرپس ویروس نوع ۳ (CyHV-3)، عامل اصلی بیماری واگیردار کوی هرپس ویروس (KHVD) در ماهی کپور معمولی و کوی در سرتاسر جهان است. بدین منظور از ۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی از مزارع تلفات دار و مزارع استان خوزستان که در چند سال اخیر تلفات گزارش کرده بودند، طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۶، جهت ردیابی بیماری ویروس هرپس کوی به روش مولکولی نمونه برداری شد. جهت افزایش بار ویروس در بافت‌های آبشش و کلیه، به ازای سه ماهی، سه نمونه آبشش و سه نمونه کلیه به صورت جداگانه با یکدیگر مخلوط شدند. استخراج DNA بافت با استفاده از کیت تجاری شرکت رهازیست پادتن[۱] طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای[۲] با استفاده از مسترمیکس Amplicon و پرایمرهای مربوط به ژن پلی‌مراز انجام شد. نتایج حاصل از Nested PCR نشان داد که ۳ نمونه (دو نمونه آبشش و یک نمونه بافت کلیه) از ۴۰ نمونه مخلوط شده مورد آزمایش دارای باند ۳۳۹ کیلوجفت باز بودند و به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. تعیین توالی محصولات PCR و آنالیز اولیه Blast نشان داد که توالی یکی از نمونه‌های مثبت به توالی‌های مربوط به CyHV-3 شباهت داشت. نتایج هم‌ترازی ردیف‌های نوکلئوتیدی و درخت فیلوژنی این توالی، کوی هرپس ویروس را با قطعیت تشخیص داده و با شماره دسترسی LC713276 در بانک ژن جهانی ثبت گردید.

لغات کلیدی: بیماری کوی هرپس ویروس، کپور معمولی، Nested PCR، استان خوزستان

*نویسنده مسئول

[1] Raha Zist Padtan
[2] Nested PCR

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

مقدمه

هرپس‌ویروس‌ها[1]، گروه بزرگی از ویروس‌های بیماری‌زا هستند که به طور گسترده‌ای در طبیعت پخش شده‌اند. تاکنون بیش از ۲۰۰ گونه هرپس ویروس از نرم‌تنان، ماهیان، خزندگان، دوزیستان و تمام گونه‌های پرندگان و پستانداران شناسایی شده است (Donohoe, 2013). یک ویژگی مشترک در بیماری‌زایی تمام هرپس‌ویروس‌ها، نهفتگی[2] است. این امر بدان معناست که میزبان دارای آلودگی پایدار است و احتمالاً تکثیر محدود ولی عودکننده[3] ویروس به طور مادام‌العمر در بدن میزبان رخ می‌دهد (Maclachlan and Dubovi, 2016). کلیه هرپس ویروس‌ها در راسته Herpesvirales طبقه‌بندی می‌شوند. راسته مزبور با توجه به تفاوت‌های اساسی فیلوژنتیک به سه خانواده شامل هرپس ویریده[4]، آلوهرپس‌ویریده[5] و مالاکوهرپس‌ویریده[6] تقسیم‌بندی شده است (King *et al*., 2012). سه جنس از خانواده آلوهرپس ویریده شامل: *Cyprinivirus*، *Ictalurivirus* و *Salmonivirus* آلوده‌کننده ماهیان هستند که در مجموع دارای ۱۰ گونه می‌باشند. در کپور ماهیان سه نوع هرپس ویروس وجود دارد که شامل هرپس ویروس نوع ۱ (آبله کپور) (CyHV-1)، هرپس ویروس نوع ۲ (ویروس نکروز بافت خونساز گلدفیش) (CyHV-2) و هرپس ویروس نوع ۳ (CyHV-3) می‌باشند. حدود ۸۰ درصد همسانی نوکلئوتیدی بین سه ویروس وجود دارد (Pokorova *et al*., 2005).

هرپس ویروس نوع ۳ کپور ماهیان (CyHV-3) یک ویروس نوظهور به‌شدت مسری است که سبب ایجاد تلفات حاد و گسترده در جمعیت ماهیان کپور معمولی و کوی می‌شود. همچنین این ویروس با نام عمومی کوی هرپس ویروس[7] (KHV) نیز شناخته شده و در گذشته ویروس نکروز آبشش و نفریت بینابینی کپور خوانده می‌شد. کوی هرپس ویروس به عنوان کشنده‌ترین و سریع‌الانتشارترین پاتوژن ویروسی شناخته شده ماهیان گرمابی محسوب می‌شود. بیماری ناشی از این ویروس، در کنار ویرمی بهاره کپور[8] (SVC)، جزء دو بیماری مختص کپور ماهیان است که گزارش شیوع آنها از سوی سازمان جهانی OIE، لازم الاخطار می‌باشد (Gostesman *et al*., 2014). ساختار ویریون CyHV-3 شامل یک کپسید بیست وجهی به قطر ۱۱۰-۱۰۰ نانومتر است که از ۱۶۲ کپسومر تشکیل شده است. ژنوم ویروس، یک مولکول DNA دو رشته‌ای خطی است که با یک تگومنت بی‌نظم احاطه شده است (Ilouze *et al*., 2011).

نخستین مورد همه‌گیری شدید بیماری کوی هرپس ویروس، در آلمان در سال ۱۹۹۷ میلادی گزارش شد و در سال ۱۹۹۸ تأیید گردید (Wolf, 1998; Fijan *et al*., 1999; Gilad *et al*., 2004). پس از آن بیماری از سایر نقاط جهان در آمریکا، اروپا و آسیا گزارش شد (Hedrick *et al*., 2000; Waltzek *et al*., 2004; Pokorova *et al*., 2007). در ایران، CyHV-*3* در چندین مورد به روش PCR مورد شناسایی قرار گرفته ولی به صورت بالینی تأیید نشده است. عمده این ردیابی‌ها از سندروم تلفات تابستانه کپور ماهیان به‌ویژه از استان‌های گیلان و خوزستان بوده است (طاهری میرقائد و همکاران، ۱۳۹۸؛ Rahmati-Holasoo *et al*., 2016). میزبان ویروس CyHV-3، به طور مشخص و اثبات شده قطعی، کپور معمولی و کوی می‌باشد (Miyazaki *et al*., 2008). ماهیان در دمای آب ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر به بیماری کوی هرپس ویروس حساس هستند و می‌تواند موجب مرگ و میر ۱۰۰-۸۰ درصدی شود (Reed, CyHV-3 2014)، ماهیان را در تمام سنین (نوجوان تا بالغ) دچار آلودگی می‌کند، ولی به‌نظر می‌رسد، ماهیان جوان‌تر دارای حساسیت بالاتری هستند (Ito *et al*., 2007).

[1] Herpesviruses
[2] Latency
[3] Recurrent
[4] Herpesviridae
[5] Alloherpesviridae
[6] Malacoherpesviridae
[7] Koi Herpes Virus
[8] Spring viraemia of carp

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

کوی هرپس ویروس در ماهیان بیمار منجر به ایجاد طیف متنوعی از علائم بالینی و رفتاری از جمله بی‌حالی، تنفس شدید، کاهش اشتها، بی‌رنگی پوست، مشاهده کانون‌های سفید رنگ در رشته‌های آبشش، شنای تحریکی قبل از مرگ، خونریزی در آبشش‌ها، لکه‌های سفید رنگ روی پوست، زخم‌های جلدی، گود رفتگی چشم‌ها و تلفات بالا و سنگین در ۴۸-۲۴ ساعت بعد از بروز علائم بالینی می‌شود (Bergmann *et al.*, 2010). عمده‌ترین تغییرات بافتی در ماهیان تلف شده نیز شامل، پرولیفراسیون اپیتلیوم آبشش، نکروز در آبشش‌ها، نکروز در سلول‌های پارانشیم کبد، طحال، کلیه و لوله گوارش به همراه حضور ماکروفاژهای فراوان با ذرات هضم نشده در داخل آنها، وجود گنجیدگی داخل هسته‌ای در تعدادی از سلول‌های بافت مغز، قلب، روده، سلول‌های آبششی، کلیه‌ی سلول‌های خونساز، نکروز انعقادی در سلول‌های خونساز کلیه و تورم سلولی در سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیه است (Miyazaki *et al.*, 2008).

روش‌های تشخیصی مختلفی برای شناسایی CyHV-3 مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به روش‌های سرولوژیک، تکنیک‌های هیستوپاتولوژی، آزمایش‌های مولکولی، کشت سلول و ... اشاره کرد (Li *et al.*, 2017).

با توجه به تلفات بالای کپور ماهیان در فصل بهار و ابتدای پاییز در منطقه خوزستان، مطالعه در خصوص این بیماری به منظور به‌کارگیری امکانات و راهبردهای پیشگیرانه و درمانی مؤثر در پرورش ماهیان گرمابی، حائز اهمیت می‌باشد. لذا، هدف از این پژوهش بررسی حضور و بیماری‌زایی کوی هرپس ویروس در گونه کپور ماهیان پرورشی در استان خوزستان می‌باشد. بدین منظور، از مزارع فعال دارای تلفات یا با سابقه تلفات طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۶، جهت ردیابی بیماری کوی هرپس ویروس نمونه‌برداری و به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

با توجه به پراکنش مزارع پرورش ماهیان گرمابی استان خوزستان، کارگاه‌های پرورشی براساس فواصل، محل تأمین آب و تراکم کارگاه‌ها به سه منطقه A (در شمال استان خوزستان)، B (حومه اهواز) و منطقه C (مزارع جنوبی استان) تقسیم‌بندی شدند. سپس برای بررسی احتمال حضور ویروس در مناطق فوق، از مزارع فعال دارای تلفات یا با سابقه تلفات طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۶، نمونه‌گیری براساس گزارش تلفات در فصول پاییز و بهار، طبق جدول ۱، انجام شد. در مجموع، ۶۰ نمونه ماهی از سه منطقه تهیه شد. در اکثر ماهیان تلف شده، خونریزی و نکروز در آبشش‌ها، ایجاد لکه‌های سفید رنگ روی پوست و فرورفتگی چشم‌ها مشاهده شد. تعداد ۱۰ نمونه ماهی به ظاهر سالم نیز از مزارع فاقد گزارش و سابقه تلفات با علائم مشابه، به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. جهت بررسی ویروس شناسی و آزمایش مولکولی، از هر ماهی، نمونه‌های آبشش و بافت نرم (کلیه) اخذ گردید و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری شدند.

جدول ۱: تعداد نمونه هر منطقه

Table 1: Number of samples per region

مناطق نمونه گیری	تعداد ماهی	تعداد نمونه آبشش Pooled	تعداد نمونه کلیه Pooled	سال اخذ نمونه
منطقه A	۲۱	۷	۷	۱۳۹۶،۱۳۹۸،۱۴۰۰
منطقه B	۲۴	۸	۸	۱۳۹۶،۱۳۹۸،۱۴۰۰
منطقه C	۱۵	۵	۵	۱۳۹۸،۱۴۰۰

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

ردیابی مولکولی CyHV-3

ردیابی CyHV-3 در تلفات کپور ماهیان با استفاده از آزمایش Nested PCR انجام شد. بدین‌منظور، ابتدا از هر استخر به ازای هرسه ماهی، بافت‌های آبشش و کلیه به‌طور جداگانه با یکدیگر مخلوط و همگن (Pooled) شدند. سپس ۲۰-۱۰ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌های بافتی همگن شده به‌وسیله کیت تجاری استخراج DNA از بافت (Raha Zist Padtan) براساس دستورالعمل کیت، مورد استخراج DNA قرار گرفتند. در ادامه، با استفاده از مسترمیکس Amplicon و پرایمرهای مربوط به ژن پلی‌مراز (جدول ۲)، آزمایش Nested PCR طبق روش Engelsma و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در Nested PCR

Table 2: Primers used for the Nested PCR

نام پرایمر	توالی	اندازه محصول
CyHVpolF1	5′- CCAGCAACATGTGCGACGG -3′	bp۳۶۲
CyHVpolR1	5′- CCGTARTGAGAGTTGGCGCA -3′	
CyHVpolF2	5′- CGACGGVGGYATCAGCCC -3′	bp۳۳۹
CyHVpolR2	5′- GAGTTGGCGCAYACYTTCATC -3′	

در مرحله اول این آزمایش، مخلوط واکنش (در مجموع، ۲۵ میکرولیتر) شامل ۱µl (۱۰ پیکومول) از هر یک از پرایمرهای CyHVpolF1 و CyHVpolR1، ۲/۵ µl از DNA الگو، ۸µl آب مقطر و ۱۲/۵µl مسترمیکس 2X بود. در مرحله دوم آزمایش نیز، مخلوط واکنش (در مجموع، ۲۵ میکرولیتر) شامل ۱ µl (۱۰ پیکومول) از هر یک از پرایمرهای داخلی CyHVpolF2 و CyHVpolR2، ۱µl محصول مرحله اول آزمایش، ۹/۵µl آب مقطر و ۱۲/۵µl مسترمیکس X۲ بود. برنامه دمایی برای دو مرحله مشابه بوده و در جدول ۳ ارائه شده است. شایان ذکر است، در هر آزمایش از آب به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده از تلفات کپور ماهیان در اثر CyHV-3 در استان گیلان (نمونه اهدایی از بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۳: شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3: The polymerase chain reaction program

نوع واکنش	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۱۸۰	۱ چرخه
واسرشته‌سازی	۹۵	۳۰	۴۰ چرخه
اتصال آغازگرها	۵۵	۳۰	
تکثیر	۷۲	۴۵	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱ چرخه

در نهایت محصولات PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران) در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز شده و تحت تابش نور UV در دستگاه ترانس ایلومیناتور (Uvitec، انگلستان) مورد مشاهده قرار گرفتند.

تعیین توالی محصول PCR و آنالیزهای فیلوژنتیکی

محصولات نهایی Netsted PCR که طولی در حدود ۳۳۹ جفت باز داشتند همراه با پرایمرهای مرحله دوم Netsted PCR برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال شدند. پس از دریافت نتایج و انجام اولیه آزمون بلاست جهت اطمینان از صحت توالی، با استفاده از برنامه Mega

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

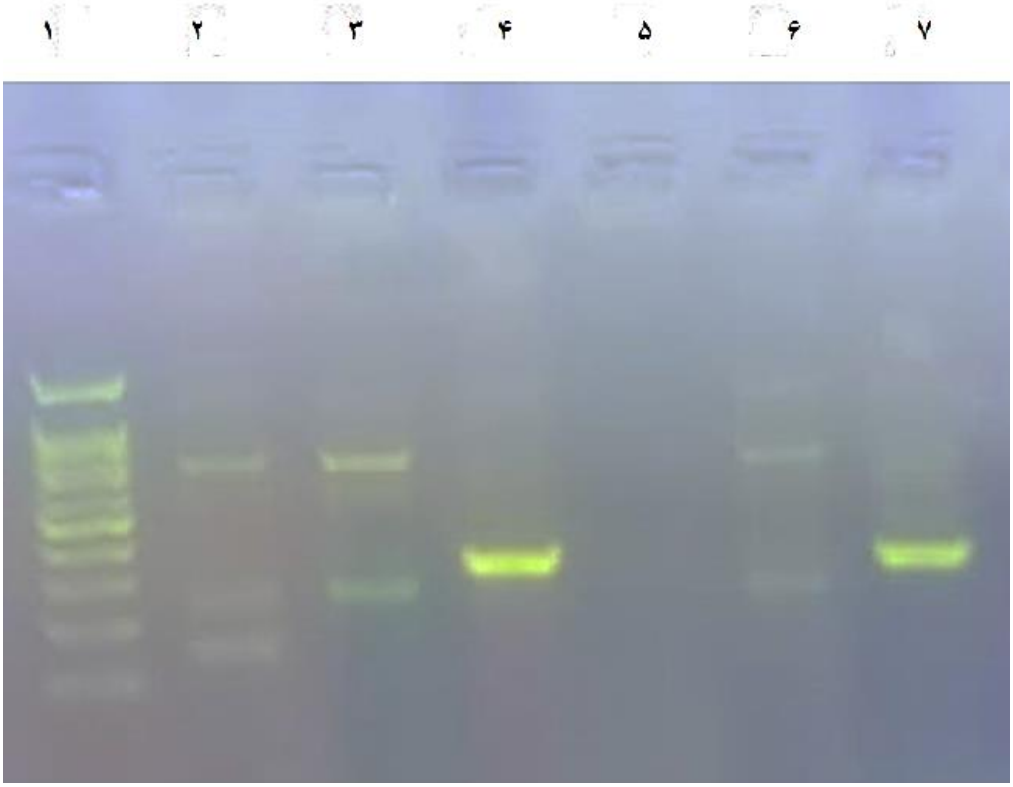
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

6، توالی‌های بدست آمده در کنار تعدادی از توالی‌های CyHV-3 و توالی سایر هرپس ویروس‌های کپور شامل هرپس ویروس‌های ۱، ۲، ۴ و ۵ از مناطق مختلف دنیا هم‌تراز شده و مورد ارزیابی فلوژنتیکی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج مطالعات مولکولی

بر اساس نتایج حاصل از بررسی مولکولی ۲۰ نمونه آبشش (هر نمونه مخلوطی از بافت آبشش سه قطعه ماهی) و ۲۰ نمونه بافت کلیه (هر نمونه مخلوطی از بافت کلیه سه قطعه ماهی) از تلفات مزارع پروش ماهیان کپور در استان خوزستان، یک نمونه آبشش و یک نمونه کلیه از یک مزرعه و یک نمونه آبشش از مزرعه‌ای دیگر، از تلفات سال ۱۴۰۰ در آزمون Nested PCR مثبت شدند. موارد مثبت محصولی با وزن مولکولی ۳۳۹ جفت باز تولید نمودند (شکل ۱).



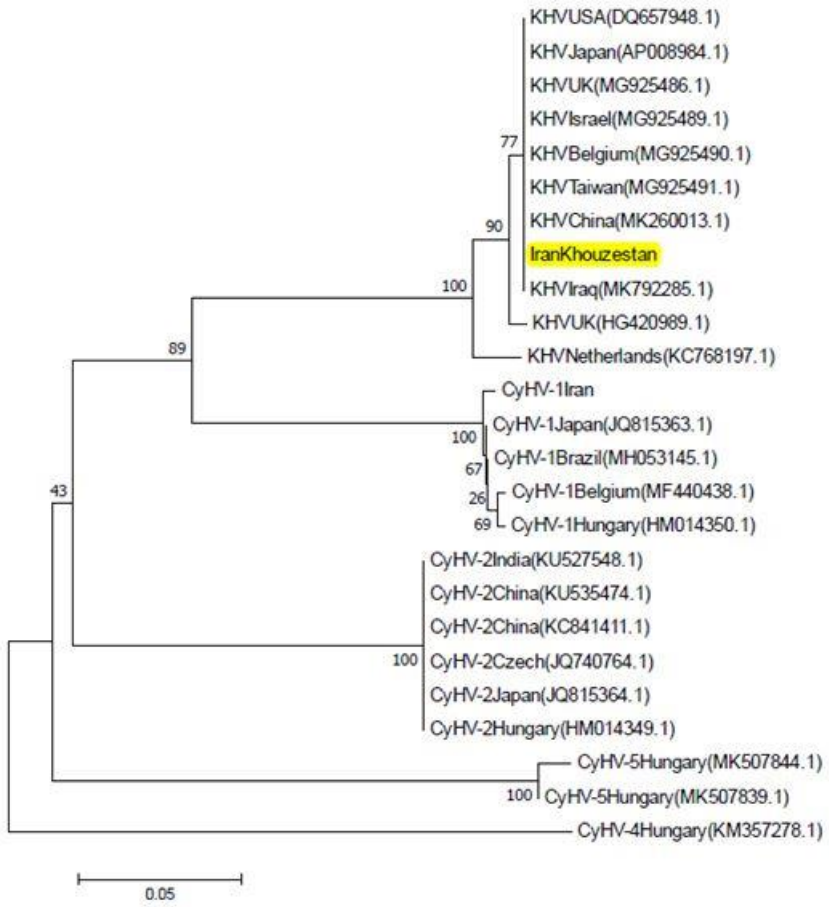
شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR مرحله دوم بر روی ژل آگارز. ستون ۱ نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۲، ۳ و ۶ سه نمونه منفی، ستون ۴ یک نمونه مثبت، ستون ۵ شاهد منفی و ستون ۷ شاهد مثبت را نشان می‌دهند.

Figure 1: Electrophoresis of PCR product on agarose gel.Lane 1: 1: Ladder (100 bp), Lanes 2,3,6: negative samples, lane 4: positive sample, lane 5: negative Control, lane 7: positive Control

تعیین توالی محصولات PCR و آنالیز اولیه Blast نشان داد که توالی نمونه مثبت مزرعه دوم (به طور موقت Iran Khouzestan نامیده شد)، با توالی‌های مربوط به CyHV-3 شباهت داشت. پس از هم‌ترازی ردیف‌های نوکلئوتیدی و رسم درخت فیلوژنی (شکل ۲) این توالی با قطعیت کوی هرپس ویروس تشخیص داده شد و با شماره دسترسی LC713276 در بانک ژن جهانی ثبت گردید. همچنین تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیک، بیانگر حضور CyHV-1 DNA در نمونه‌های مثبت مزرعه اول بود.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]



شکل ۲: آنالیز فیلوژنی حاصل از همترازی توالی یکی از محصولات PCR که Iran Khouzestan نامیده شد (با هایلایت زرد مشخص شده است) با توالی هایی از هرپس ویروس‌های ۱ تا ۵ کپور که از بانک ژن استخراج شدند.

Figure 2: Phylogeny analysis resulting from one of the PCR products sequence alignment that named Iran Khouzestan (highlighted in yellow) with the sequences of carp herpesviruses 1 to 5 extracted from the gene bank

بحث

ماهی کپور معمولی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی جهان محسوب می شود به‌طوری‌که میزان تولید آبزی‌پروری جهانی این ماهی در سال ۲۰۱۸، با عبور از ۴/۱۸۹ میلیون تن، بیش از ۷/۷ درصد از کل آبزی پروری ماهیان در جهان را به‌خود اختصاص داده است و از رتبه چهارم تولید جهانی برخوردار می‌باشد (FAO, 2020). در ایران نیز این گونه حدود ۳۵ درصد از کل تولید ماهیان گرمابی را شامل می‌شود. در این بین، استان خوزستان به عنوان یکی از مهم‌ترین قطب‌های تولید ماهیان گرمابی، در سال ۱۳۹۹، رتبه اول تولید این ماهیان در کشور را با تولید بیش از ۷۲ هزار تن به‌خود اختصاص داده که حدود ۳۵٪ آن مربوط به کپور معمولی بوده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۴۰۰). طی چند سال اخیر، تلفات ماهی کپور معمولی به عنوان مهم‌ترین چالش صنعت پرورش ماهیان گرمابی در کشور تبدیل شده به‌طوری‌که سال ۱۳۹۶ اطلاعات منتشر نشده حاکی از تلفات بیش از ۲۰٪ در استان خوزستان بوده است. در میان عوامل بیماری‌زا، نقش ویروس‌ها به دلیل درمان‌ناپذیری، مسری بودن و تشخیص دشوار، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. براساس

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE)، ده بیماری مسری، لازم الاخطار است و بیماری هرپس ویروس ماهی کوی از دسته بیماری‌های ویروسی ماهیان گرمابی می‌باشد که در این فهرست قرار دارد (Gostesman *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر، با استفاده از آزمایش Nested PCR نمونه‌های بافت آبشش و کلیه ۶۰ ماهی کپور از مزارع پرورش ماهی دارای تلفات یا با سابقه تلفات طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۶ مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده یک نمونه آبشش و یک نمونه بافت کلیه از یک مزرعه و یک نمونه آبشش از مزرعه‌ای دیگر، از مزارع شهرستان‌های جنوبی استان خوزستان، از تلفات سال ۱۴۰۰ در آزمایش Nested PCR مثبت شدند. پس از تعیین توالی محصولات PCR و انجام آنالیزهای فیلوژنیک، حضور DNA هرپس ویروس تیپ ۳ تنها در نمونه مزرعه دوم اثبات شد و نتیجه مثبت نمونه‌های مزرعه اول ناشی از حضور DNA هرپس ویروس تیپ ۱ در این نمونه‌ها بود.

حضور کوی هرپس ویروس تاکنون در مزارع پرورش ماهیان گرمابی استان خوزستان از سوی سازمان دامپزشکی مورد تأیید قرار نگرفته و به رغم تهدیدات ناشی از آن، تحقیقات صورت گرفته در خصوص آن در کشور بسیار ناچیز بوده است. با این وجود شواهدی مبنی بر حضور ویروس در کشورمان ردیابی شده است. رحمتی هولاسو و همکاران (۲۰۱۶) اولین گزارش را در این رابطه ارائه داده‌اند که با استفاده از بررسی‌های بالینی، هیستوپاتولوژیک و مولکولی (Nested PCR) ویروس CyHV-3 را در بچه ماهیان و مولدین کوی در مراکز تکثیر ماهیان زینتی استان تهران مورد شناسایی قرار دادند. همچنین نتایج حاصل از بررسی‌های آسیب شناسی و مولکولی (Nested PCR) طاهری میرقائد و همکاران (۱۳۹۸) از تلفات ماهی کپور در استان‌های خوزستان و گیلان طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ بیانگر ابتلا برخی مزارع پرورشی در این استان‌ها به بیماری کوی هرپس ویروس می‌باشد.

مشاهده تلفات و نمونه‌گیری از ماهیان بیمار با شروع فصل گرما (انتهای بهار) و شروع فصل سرما (پاییز) صورت گرفت که بیانگر نقش دما در بروز بیماری می‌باشد. Gilad و همکاران (۲۰۰۴) نیز دمای آب را فاکتوری مهم در بیماری‌زایی CyHV-3 دانستند و اظهار داشتند بیماری ناشی از این ویروس وابسته به دما می‌باشد و مرگ و میر در دامنه دمایی ۲۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد.

یافته‌های این تحقیق حضور عامل کوی هرپس ویروس در منطقه خوزستان را با استفاده از روش Nestad-PCR که روش دقیق و قابل اعتمادی است، تأیید نمود. اگر چه تعداد نمونه مثبت مشاهده شده نسبت به کل نمونه‌های اخذ شده قابل توجه نبود، ولی نگارندگان مقاله اعتقاد دارند که عامل بیماری در مزارع پرورش کپور ماهیان استان خوزستان حضور دارد و تعداد کم نمونه مثبت می‌تواند به دلایل ذیل رخ داده باشد: ۱- ساختار ویژه ژنوم ویروس و مشکل در تشخیص مولکولی ویروس، ۲- نگارندگان احتمال می‌دهند به رغم حضور ویروس در منطقه و ماهیان، بار ویروسی در بافت‌های ماهی به اندازه‌ای نیست که قابل تشخیص در روند PCR باشد و اگر شرایط دمایی (به‌ویژه استرس کاهش دما در فصل پاییز به حدود ۲۲-۲۳ درجه) رخ ندهد، بیماری به صورت حاد و با تلفات بالا ایجاد نمی‌گردد. شرایط مناسب دمایی و ایجاد بیماری به صورت عمومی همراه تلفات باعث افزایش بار ویروسی در بافت‌ها شده است و تشخیص مولکولی را نیز مثبت می‌کند. پس احتمال دارد در نمونه‌هایی که ویروس قابل تشخیص نبوده، ویروس حضور داشته ولی بار ویروسی به‌حدی که قابل تشخیص مولکولی باشد، نبوده است. در مطالعات مشابه هم، چنین گزارش‌هایی قابل مشاهده است.

Eide و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای با بررسی ژنوم کوی هرپس ویروس در ماهی‌های سالم بدون علائم بالینی اما با سابقه عفونت ویروس، نشان دادند، CyHV-3، مانند هرپس ویروس پستانداران می‌تواند در سلول‌های سفید خون محیطی و بافت‌های مختلف به صورت نهفته باقی بماند. نوع گلبول‌های سفید آلوده به ویروس به طور دقیق مشخص نیست اما احتمال می‌دهند، سلول‌های B و

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

سلول‌های به‌جز T مکان‌های اصلی نهفتگی KHV باشند. این محققین نتایج حاصل از مطالعه خود را این‌گونه شرح دادند: نهفتگی کوی هرپس ویروس با تنش دمایی ۲۳-۱۷ درجه سانتی‌گراد مجدد فعال می‌شود که می‌تواند دلیل شیوع بیماری در طول تابستان باشد. ردیابی DNA ویروس با جمعیت گلبول‌های سفید بافت‌ها در طول نمونه‌گیری و کالبدگشایی ارتباط مستقیم دارد. همچنین گلبول‌های قرمز و سایر ترکیبات بافتی می‌تواند در تشخیص ویروس با آزمایش PCR تداخل ایجاد کند. کیفیت DNA ویروسی از هر بافت نیز ممکن است نقش مهمی در تشخیص ویروس داشته باشد. اگر DNA ویروسی در حین کالبدگشایی و آماده‌سازی نمونه به طور گسترده‌ای تخریب شود، حساسیت تشخیص کاهش می‌یابد. بنابراین، ممکن است تمامی بافت‌ها حاوی DNA ویروس باشند اما PCR به دلیل تخریب DNA در بافت تخریب شده نتواند ژنوم ویروس را تشخیص دهد.

از چهار گونه پرورشی ماهیان گرمابی در مزارع پرورش ماهی استان خوزستان، بیماری و تلفات صرفاً در کپور معمولی مشاهده شد و با وقوع تلفات در یک استخر، بیماری به‌سرعت در سایر استخرهای مزارع مربوطه مشاهده شد که بیانگر حساسیت کپور معمولی نسبت به سایر گونه‌ها و همه‌گیری و سرایت بالای ویروس می‌باشد. Rathore و همکاران (۲۰۱۲) و Bergmann و همکاران (۲۰۱۰) طی مطالعات گسترده از مقاومت سایر گونه‌های کپور نسبت به بیماری اظهار داشتند که CyHV-3 اساساً باعث ایجاد مرگ و میر حاد در کپور معمولی و کوی (یک واریته رنگی از کپور معمولی) می‌شود و سایر گونه‌ها فاقد علائم بالینی بوده و صرفاً حامل ویروس می‌باشند. هیبریدهای کپور معمولی و کوی با سایر کپور ماهیان غیرحساس نیز نتایج متفاوتی از نظر مقاومت به بیماری داشته است. برای مثال، هیبریدهای کوی با کاراس تا ۱۰۰ درصد دچار تلفات شدند، ولی تلفات هیبرید گلدفیش با کوی، معمولاً زیر ۵۰ درصد می‌باشد (Bergmann *et al.*, 2010).

طبق نتایج حاصل از مطالعه مولکولی، متاسفانه بیماری KHV در برخی مزارع جنوبی کپورماهیان کشور ردیابی شده است و این مسئله باید مورد توجه پرورش‌دهندگان، دام‌پزشکان و سازمان دامپزشکی کشور جهت به‌کارگیری امکانات و استراتژی‌های پیشگیرانه و درمانی مؤثر در پرورش قرار بگیرد.

با توجه به ماهیت ویروسی بیماری، اولین قدم در مراحل کنترل و پیشگیری، اثبات حضور و تعیین هویت کامل ویروس است. با توجه به فقدان درمان موثر، توسعه یک روش تشخیص حساس، سریع و اختصاصی جهت شناسایی این ویروس و جلوگیری از شیوع آن، حیاتی می‌باشد. بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی در جهت روش‌های تشخیص سریع و انجام آزمایش‌های تجربی در جهت کنترل بیماری، جلوگیری از شیوع ویروس و در نهایت ریشه‌کنی CyHV-3 ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه‌ی دکترای PhD دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

سازمان شیلات ایران.، ۱۴۰۰. سالنامه آماری ۱۳۹۹-۱۳۹۴. معاونت برنامه‌ریزی و مدیریت منابع، ۶۴ صفحه.

طاهری میرقائد، ع.، عنایتی، الف.، سلطانی، م.، علیشاهی، م.، رحمتی هولاسو، ه.، حقیقی خیابان اصل، ع. و حسینی شکرابی، س.پ.، ۱۳۹۸. ردیابی بیماری کوی هرپس ویروس (KHVD) در برخی مزارع کپور ماهیان کشور: مطالعه مولکولی و آسیب شناسی. مجله دامپزشکی ایران، ۱۵(۲)، ۷۸-۶۹.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

Bergmann, S.M., Sadowski, J., Kiełpiński, M., Bartłomiejczyk, M., Fichtner, D., Riebe, R., Lenk, M. and Kempter, J., 2010. Susceptibility of koi× crucian carp and koi× goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *Journal of Fish Diseases*, 33(3), 267-272. DOI:10.1111/j.1365-2761.2009.01127.x

Donohoe, O., 2013. An investigation into the existence of Cyprinid Herpesvirus 3 encoded donomicroRNAs. Dissertation, University of Dublin.356 P.

Eide, K.E., Miller-Morgan, T., Heidel, J.R., Kent, M.L., Bildfell, R.J., LaPatra, S., Watson, G. and Jin, L., 2011. Investigation of koi herpesvirus latency in koi. *Journal of Virology*, 85(10), 4954-4962. DOI:10.1128/JVI.01384-10

Engelsma, M.Y., Way, K., Dodge, M.J., Voorbergen-Laarman, M., Panzarin, V., Abbadi, M., El-Matbouli, M., Skall, H.F., Kahns, S. and Stone, D.M., 2013. Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(2), 113-120. DOI: 10.3354/dao02666

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. 224 P.DOI.org/10.4060/ca9229en

Fijan, N., 1999. Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders,Vol.3. CAB International, Oxon, pp. 177–244.

Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H. and Hedrick, R.P., 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(3), 179-187.

Gotesman, M., Soliman, H., Besch, R. and El-Matbouli, M., 2014. In vitro inhibition of Cyprinid herpesvirus-3 replication by RNAi. *Journal of Virological Methods*, 206, 63-66. DOI:org/10.1016/j.jviromet.2014.05.022

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H. and Eldar, A., 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(1), 44-57. Doi:org/10.1577/1548-8667(2000)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2

Ilouze, M., Davidovich, M., Diamant, A., Kotler, M. and Dishon, A., 2011. The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecological Research*, 26, 885-892. DOI:org/10.1007/s11284-010-0694-2

Ito, T., Sano, M., Kurita, J., Yuasa, K. and Iida, T., 2007. Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

Pathology, 42, 107–109. DOI:10.3147/JSFP.42.107

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J., 2012. Virus taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, Elsevier; 1338 P.

Li, Y., Zheng, S., Wang, Q., Bergmann, S.M., Zeng, W., Wang, Y., Liu, C. and Shi, C., 2017. Detection of koi herpesvirus (KHV) using a monoclonal antibody against *Cyprinus carpio* IgM. *Archives of Virology*, 162(8), 2381-2385. DOI: 10.1007/s00705-017-3357-6

Maclachlan, N.J. and Dubovi, E., 2016. Herpesvirales. In: Fenner's veterinary virology, 5th ed. Academic press, Davis, California, USA, pp. 179-202.

Miyazaki, T., Kuzuya, Y., Yasumoto, S., Yasuda, M. and Kobayashi, T., 2008. Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80(1), 1-11. DOI: 10.3354/dao01929

Pokorova, D., Vesely, T., Piackova, V., Reschova, S. and Hulova, J., 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Veterinarni Medicina*, 50(4), 139-148. DOI: org/10.17221/5607-VETMED

Pokorova D., Piackova V., Cizek A., Reschova S., Hulova J., Vicenova M. and Vesely, T., 2007. Tests for the presence of Koi herpes virus (KHV) in common carp (*Cyprinus carpio carpio*) and Koi carp (*Cyprinus carpio koi*) in the Czech Republic. *Veterinary Medicine*, 52(12), 562-568. DOI:10.17221/1883-VETMED

Rahmati-Holasoo, H., Zargar, A., Ahmadivand, S., Shokrpoor, S., Ezhari, S. and Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., 2016. First detection of koi herpesvirus from koi, *Cyprinus carpio L*. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study. *Journal of Fish Disease*, 39(10), 1153-63. Doi:10.1111/jfd.12448. Epub 2016 Jan 27.

Rathore, G., Kumar, G., Raja Swaminathan, T. and Swain, P., 2012. Koi herpes virus: a review and risk assessment of Indian aquaculture. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 124-133. DOI: 10.1007/s13337-012-0101-4

Reed, A. N., 2014. The conserved biology of herpesvirus latency: a study in cyprinid herpesvirus 3. Dissertation, University of Oregon State.

Waltzek T.B., Kelley G.O., Yun S.C., McDowell T.S. and Hedrick, R.P., 2004. Relationships of Koi Herpesvirus (KHV) to Herpes-like Viruses of Fish and Amphibians. In: Proceedings, 35th Annual Conference, International Association for Aquatic Animal Medicine, University of California, 16-17 June 2004.

Wolf, K., 1988. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY. 473P.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]

Molecular study of Koi herpesvirus in warm-water fish farms mortality in Khuzestan province

Shahvazi S.[1]; Rezaie A.[1]; Seifi Abad Shapouri M.R.[1]; Alishahi M.[2]; Ahangarzadeh M.[3]

[*]a.rezaie@scu.ac.ir; pathrezaie@gmail.com

1-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
2-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
3-South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

Abstract

Herpesvirus type 3 (CyHV-3) is the main cause of contagious koi herpesvirus infectious (KHVD) in common carp and koi worldwide. For this purpose, 60 pieces of common carp from farms with losses and farms from Khuzestan province that reported losses in the last few years were sampled during 2017 to 2021 for detection of Koi herpes virus disease by molecular method. In order to increase the virus load in gill and kidney tissues, three gills and kidney samples were separately mixed together for each three fish. DNA extraction from the tissue was performed using the commercial kit of Raha Zist Padtan Company according to the instructions. Afterward, Nested PCR test was performed using Amplicon master mix and polymerase gene primers. The results of the Nested PCR showed that 3 samples (two gill samples and one kidney tissue sample) out of 40 mixed samples tested had 339 kbp band and were considered as positive samples. Sequencing of PCR products and preliminary Blast analysis showed that the sequence of one of the positive samples was similar to the CyHV-3. The results of the alignment of the nucleotide rows and the phylogeny tree of this sequence confirmed Koi herpesvirus and it was registered in the World Gene Bank with the accession number of LC713276.

Keywords: Koi herpesvirus disease, Common carp, Nested PCR, Khuzestan Province

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.9.5]