

مطالعه‌ی پراکنش بیماری نکروز عفونی پانکراس در مزارع قزل‌آلای ایران به روش RT-PCR

مهدی سلطانی^{۱*}، شقایق روح‌الهی^۲، اشکان زرگر^۳، کاظم عبدی^۴، سمیرا محمدیان^۲ و امرا.. قاجاری^۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۰

چکیده

در این مطالعه پراکنش جغرافیایی بیماری ویروس نکروز عفونی پانکراس به روش مولکولی (RT-PCR) در ۱۸ استان کشور و در قالب بررسی موردی طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۱ انجام گرفته است. با توجه به بروز عفونت‌های هم‌زمان بیماری‌های نکروز عفونی پانکراس (IPN)، نکروز عفونی بافت خون‌ساز (IHN) و سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) و نیز علائم بالینی مشابه ناشی از این بیماری‌ها، همه‌ی موارد نمونه‌های مورد مطالعه از بچه ماهیان مزارع ماهیان قزل‌آلای بیمار با علائم بالینی بی‌اشتهایی، اگزوفتالمی، تیره شدن پوست و تلفات بالا و در برخی موارد نیز از نمونه‌های اسپرم و تخمک اخذ گردید. نتایج حاصل نشان داد که از ۲۱۴ نمونه اخذ شده، تعداد ۹۶ مورد آن‌ها با فراوانی نسبی ۴۴/۸۵ درصد در ۱۵ استان کشور مبتلا به بیماری IPN بودند. بیش‌ترین فراوانی نسبی در لرستان، اصفهان، چهار محال و بختیاری، فارس، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران و قزوین بود. با توجه به پراکنش بیماری در مناطق شمالی، شمال غربی، غرب، جنوب غرب و جنوب کشور، عدم مشاهده‌ی آن در سه استان گلستان، گیلان و همدان و نظر به اهمیت اقتصادی آن توجه به روش‌های پیش‌گیری و کنترل بیماری برای کاهش خسارت وارده، امری ضروری است.

کلمات کلیدی: بیماری نکروز عفونی پانکراس، نکروز عفونی بافت خون‌ساز، سپتی سمی هموراژیک ویروسی، RT-PCR

مقدمه

سخت‌پوستان در سرتاسر دنیا گزارش شده است. در برخی از مناطق جغرافیایی نیز با افزایش فعالیت‌های پرورش ماهی، حتی در آب دریا، خسارات اقتصادی به دلیل بیماری‌های ویروسی همانند IPN رو به فزونی یافته است (Joh et al. 2000). از آن جایی که ویروس IPN هم از طریق افقی و هم عمودی قابل انتقال می‌باشد، در راستای جلوگیری از انتقال عمودی ویروس IPN برای چندین دهه، مولدین آزاد ماهیان مورد آزمایش قرار گرفته و تخم‌های والدین حامل IPNV بررسی می‌شده‌اند (McAllister et al. 1993, Wolf et al. 1968). روش

بیماری نکروز عفونی ویروسی پانکراس (IPN) تقریباً تنها بیماری ویروسی کشنده در ماهیان است که بیش‌ترین مطالعات و در نتیجه بیش‌ترین اطلاعات در مورد پاتوبیولوژی آن موجود است (Bain et al. 2008). ویروس عامل بیماری نوعی بیرناویروس RNA دار دو رشته‌ای و با اندازه‌ی حدود ۶۰ نانومتر و حاوی دو ناحیه‌ی ژنومی A و B بوده و متعلق به گروه آکوایرناویروس می‌باشد (Biering et al. 1997, Roberts and Pearson 2005). جدایه‌های این ویروس از گونه‌های مختلف ماهی‌های آب شیرین، آب دریا، آزادماهیان، غیر آزادماهیان، نرم‌تنان و

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: msoltani@ut.ac.ir

^{۱*} استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۲ دانشجوی دکتری بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۳ استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

^۴ متخصص بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دفتر بررسی و مدیریت بیماری‌های آبزیان، سازمان دامپزشکی کشور

^۵ کارشناس دفتر بررسی و مدیریت بیماری‌های آبزیان، سازمان دامپزشکی کشور

بافت‌های خون‌ساز (IHN) و سپتی‌سمی هموراژیک و ویروسی (VHS) در ماهی قزل‌آلا، این مطالعه با هدف تشخیص مولکولی بیماری در مراکز تکثیر و حد واسط قزل‌آلای ۱۸ استان و تعیین پراکنش جغرافیایی آن در کشور انجام گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

این تحقیق در قالب یک مطالعه موردی و با هدف تشخیص و تعیین پراکنش منطقه‌ای این بیماری در مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور انجام گرفته است. برای نمونه‌گیری از بچه ماهیان بیمار و با علائم بالینی مانند تیرگی رنگ، آگزوفتالمی، قالب‌های مدفوعی نمونه‌گیری به عمل آمد. علائم مذکور از جمله علائم بالینی این بیماری می‌باشد که مشابه علائم بالینی برخی بیماری‌های ویروسی دیگر نظیر IHN و VHS می‌باشد. عملیات نمونه‌گیری از مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای ۱۸ استان کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، خراسان، سمنان، فارس، قزوین، کردستان، کرمان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد، گلستان، گیلان، لرستان، مازندران و همدان به عمل آمد. نمونه‌گیری‌ها به طور تصادفی و از ماهیان با داشتن یک یا چند علامت از علائم فوق‌الذکر به عمل آمد. نمونه‌ها شامل بچه ماهیان قزل‌آلا با وزن زیر ۱ تا ۵ گرمی بوده و علاوه بر آن در دو استان مازندران و کرمان علاوه بر بچه ماهیان از نمونه‌های تخمک و اسپرم مولدین نیز نمونه‌گیری به عمل آمد (بیماری فرم انتقال عمودی دارد). نمونه‌های اخذ شده بلافاصله به ظروف حاوی الکل اتانول ۷۵٪ منتقل و پس از برچسب گذاری به آزمایشگاه تخصصی مولکولی قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران منتقل شدند (قبل از انتقال بچه ماهیان به الکل، ابتدا شکم آن‌ها با قیچی برش داده می‌شد). انتخاب مزارع تکثیر و پرورش بر اساس گزارش تلفات قابل توجه و توسط ادارات کل دامپزشکی استان‌های مذکور و یا در بازرسی

کشت روی تیره‌های سلولی به عنوان روش سنتی شناسایی ویروس و بیماری حاصله می‌باشد که توسط دفتر جهانی بیماری‌های همه‌گیر (OIE) برای رسیدن به این هدف لحاظ شده است. با این حال این روش زمان‌بر بوده و نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی بسیار تخصصی است و هم‌چنین با توجه به کم بودن میزان IPNV در بافت‌های ماهیان مبتلا به این ویروس، معمولاً روش‌های آزمایشگاهی حساس مدنظر قرار می‌گیرد (Taksdal et al. 2001). امروزه استفاده از روش‌های دیگر مانند ایمنو‌هیستوشیمیایی و مولکولار (RT-PCR) به عنوان روش‌های متداول و روتین تشخیص بیماری در مزارع ماهیان به ویژه با اهداف مطالعات اپیدمیولوژیک می‌باشد (Milne et al. 2006). به طوری که امروزه استفاده از روش RT-PCR به عنوان یکی از روش‌های حساس و روتین تشخیص برای مطالعات اپیدمیولوژیک توصیه می‌شود (OIE 2009).

در ایران گزارش‌های اولیه‌ی این بیماری مربوط به سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۱۰ می‌باشد (Akhlaghi and Hosseini 2007, Raissy et al. 2010) و پس از آن نیز گزارش‌هایی در نتایج بازدیدهای کارگاهی و گزارش تلفات قابل توجه در مراکز تکثیر و حد واسط قزل‌آلای کشور طی سال‌های اخیر، آن را به یکی از موضوعات جدی و قابل توجه صنعت قزل‌آلای کشور و دستگاه‌های اجرایی مربوطه تبدیل کرده است. لذا با توجه به گزارش‌های غیر رسمی اخیر از این بیماری در کشور و از آن جایی که این بیماری یک عفونت ویروسی حاد و با تلفات بالا به ویژه در مراحل لاروی و بچه ماهی می‌باشد، هم‌چنین با توجه به این که این بیماری به هر دو روش عمودی و افقی، قابل انتقال است، در حال حاضر بهترین روش کنترل بیماری، انجام اقدامات پیش‌گیری است، لذا شناسایی بیماری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان کشور زمینه لازم را برای اتخاذ روش‌های پیش‌گیری فراهم می‌آورد. بنابراین با توجه به نکات فوق‌الذکر و تشابه بالینی این بیماری با برخی بیماری‌های ویروسی دیگر مانند نکروز عفونی

تکثیر قطعه ژنومی از طریق RT-PCR برای تشخیص نمونه‌های مثبت

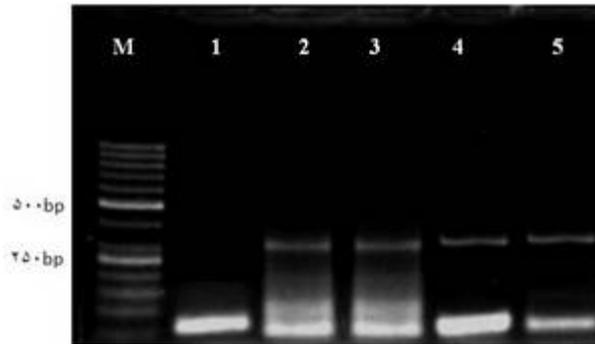
توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ژنومی شامل WB1: CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC و WB2: TCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG بود (Williams et al. 1999). این پرایمرها ناحیه ژن VP2 ویروس عامل IPN را به طور اختصاصی شناسایی و تولید باند ۲۰۶bp می‌نماید. برای تکثیر قطعه ژنومی VP2 این ویروس در روش RT-PCR از کیت RT-PCR یک مرحله (شرکت Bioer چین) استفاده شد. برای این منظور از RNA استخراجی به میزان ۰/۵ Ug، ۲/۵ μl بافر 10× RNase RT-PCR (۱۵ mM)، ۰/۵ μl از آنزیم مهارکننده RNase AMV (۴۰ u/μl، ۱ μl از هر پرایمر (۱۰ pmol)، ۰/۵ آنزیم Taq پلیمراز نسخه‌بردار معکوس (۵ u/μl)، ۰/۵ μl آنزیم Taq پلیمراز (۵ u/μl)، ۰/۵ μl dNTP (۱۰ mM)، آب عاری از RNase ۱۴/۵ میکرولیتر برای آماده‌سازی مخلوط واکنش استفاده گردید. از آن جایی که علائم بالینی و روند تلفات در لارو و بچه ماهیان قزل‌آلا ناشی از سه بیماری عمده‌ی ویروسی شامل IPN، IHN و VHS مشابه می‌باشد و از طرفی، با توجه به این که امکان بروز عفونت‌های هم‌زمان ناشی از این ویروس‌ها در مزارع ماهیان سرد آبی وجود دارد (Tafalla et al. 2006)، لذا از پرایمرهای IHN3: GTTCAACTTCAACGCCAACAGG و IHN4: TGAAGTACCCACCCCGAGCATCC برای شناسایی ویروس عامل IHN و پرایمرهای VHS3: CGGCCAGCTCAACTCAGGTGTCC و VHS4: CCAGGTTCGGTCCCTGATCCATTCTGTCC برای شناسایی ویروس عامل VHS نیز استفاده شد (Williams et al. 1999).

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad آمریکا) نیز به ترتیب شامل ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل (دور) واسرشته‌سازی (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، بسط (هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در ۷۲

کارگاهی صورت گرفته است. با توجه به این که نمونه‌گیری از موارد بیمار و در حال تلفات بوده است، لذا از هر مزرعه ماهی بیمار، تعداد ۱۰ نمونه بچه ماهی اخذ و در آزمایشگاه بسته به اندازه‌ی بچه ماهیان هر ۵ و یا ۱۰ نمونه، در قالب یک نمونه واحد، مورد آزمایش قرار گرفت. به طوری که لاروهای کوچک به طور کامل هموزن (هر ۱۰ لارو به عنوان یک نمونه واحد) و در مورد بچه ماهیان درشت‌تر از بافت‌های کلیه، طحال و کبد هر ۵ ماهی به عنوان یک نمونه واحد استفاده می‌شد. در این مطالعه که طی سال‌های ۱۳۹۰ الی ۱۳۹۱ انجام گرفته است. تعداد ۲۱۴ مورد نمونه واحد واقع در ۴۶ منطقه‌ی مختلف جغرافیایی اخذ و مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعات مولکولی استخراج RNA

برای استخراج RNA ویروسی از کیت Simply P Total RNA Extraction (BioFlux کد #BSC52M1) استفاده شد. به طور خلاصه، برای این کار از بافت‌های هموزن شده (بافت کلیه، طحال و کبد) به میزان ۶۰ میلی‌گرم به تیوب استریل منتقل و ۶۰۰ میکرولیتر محلول R2 به آن اضافه و سپس مخلوط گردید. سوسپانسیون حاصله ۳-۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفته و محلول رویی به ستون فیلتردار منتقل و برای ۳۰ ثانیه سانتریفوژ گردید. محلول جمع شده در پایین ستون فیلتردار حذف و میزان ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بافر شستشو به آن افزوده و برای ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شد. مرحله‌ی شستشو تکرار شده و سپس ۱ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰rpm صورت گرفت. ستون فیلتردار به تیوب استریل منتقل و بافر حل‌کننده به میزان ۵۰-۲۰ میکرولیتر به آن اضافه شد. سپس نمونه در دمای محیط به مدت ۱ دقیقه قرار داده و پس از آن به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شده و RNA حاصله تا زمان آزمایش RT-PCR در دمای ۷۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.



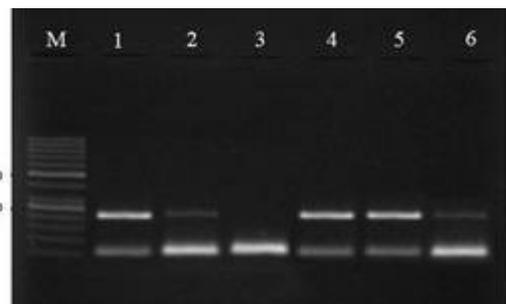
شکل ۲: ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از RNA برخی جدایه‌های ویروس IHN مورد استفاده در تحقیق
M= مارکر bp ۵۰، ۱= کنترل منفی، ۲، ۳، ۴= جدایه‌های ویروسی مورد آزمایش

نتایج حاصل از تعداد و فراوانی نسبی نمونه‌های مثبت IPNV در ۱۸ استان کشور در جدول ۱ آورده شده است. در بررسی استان‌های مورد مطالعه، نمونه‌های ۱۵ استان مثبت تشخیص داده شدند، در حالی که ۱۸ مورد مربوط به استان‌های گلستان، گیلان و همدان منفی بودند. از مجموع ۲۱۴ نمونه‌ی مورد آزمایش، تعداد ۹۶ مورد آن‌ها با فراوانی نسبی ۴۴/۸۵ درصد برای ویروس IPNV مثبت تشخیص داده شدند؛ با توجه به تعداد نمونه‌های مورد مطالعه‌ی هر استان بیش‌ترین فراوانی نسبی ابتلا به ویروس IPNV به ترتیب مربوط به آذربایجان غربی، اردبیل، لرستان، کرمانشاه، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کرمان و کهگیلویه و بویر احمد با میزان ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۸۵/۷۱ درصد، ۸۰ درصد، ۶۰ درصد، ۵۰ درصد، ۵۰ درصد و کم‌ترین فراوانی نسبی مربوط به استان‌های سمنان، خراسان، فارس به ترتیب با میزان ۲۵ درصد، ۲۱/۰۵ درصد و ۲۰ درصد می‌باشد.

درجه سانتی‌گراد) و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Bain et al. 2008). محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و باند حاصله با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ترانس ایلومیناتور (مدل XR-plus، Bio-Rad آمریکا) عکس‌برداری شد، جدایه‌های ویروس عامل IPNV به عنوان استاندارد (مثبت) (آنتی‌ژن غیر فعال شده عرضه شده توسط دکتر Igor، مرکز تحقیقات آبی‌پروری روسیه) و از نمونه‌ی استریل آب به عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

نتایج

نتایج مطالعه RT-PCR روی نمونه‌های مورد آزمایش منجر به شناسایی ویروس IPNV با تولید قطعه‌ی ژنی با وزن مولکولی ۲۰۶ bp شد (شکل ۱). لذا بر اساس نتایج RT-PCR از کل ۲۱۴ نمونه‌ی واحد (هر نمونه شامل ۱۰ بچه ماهی زیر گرم یا بافت‌های خون‌ساز ۵ ماهی بالای گرم) مورد آزمایش تعداد ۹۶ نمونه از آن‌ها به عنوان موارد مثبت IPNV شناسایی شدند. در حالی که تنها ۴ نمونه از نمونه‌ها برای ویروس عامل IHN (شکل ۲) مثبت تشخیص داده شد و تمامی نمونه‌های مورد آزمایش برای عامل ویروس VHS منفی بودند.



شکل ۱: ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از RNA برخی جدایه‌های ویروس IPNV مورد استفاده در تحقیق
M= مارکر bp ۵۰، ۱= کنترل مثبت، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶= جدایه‌های ویروسی مورد آزمایش، ۳= کنترل منفی

جدول ۱: موارد تعداد و درصد فراوانی نسبی (درصد) نمونه‌های لارو، اسپرم و تخمک قزل‌آلای مثبت و مبتلا به IPNV، IHNV و VHSV در استان‌های مورد مطالعه

استان	نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت به IPNV	فراوانی نسبی IPNV (درصد)	تعداد نمونه‌های مثبت به IHNV	فراوانی نسبی IHNV (درصد)	تعداد نمونه‌های مثبت به VHSV
آذربایجان شرقی	لارو	۹	۳	۳۳/۳	۲	۲۲/۲	-
آذربایجان غربی	لارو	۵	۵	۱۰۰	-	-	-
اردبیل	لارو	۳	۳	۱۰۰	-	-	-
اصفهان	لارو	۴	۲	۵۰	-	-	-
چهارمحال و بختیاری	لارو	۱۰	۶	۶۰	-	-	-
خراسان	لارو	۱۹	۴	۲۱/۰۵	-	-	-
سمنان	لارو	۴	۱	۲۵	-	-	-
فارس	لارو	۲۵	۵	۲۰	۱	۴	-
قزوین	لارو	۸	۳	۳۷/۵	-	-	-
کردستان	لارو	۲۹	۱۸	۶۴/۲۸	-	-	-
کرمان	اسپرم، تخمک و لارو	۶	۳	۵۰	-	-	-
کرمانشاه	لارو	۲۰	۱۶	۸۰	-	-	-
کهگیلویه و بویراحمد	لارو	۶	۳	۵۰	-	-	-
گلستان	لارو	۲	-	۰	-	-	-
گیلان	لارو	۵	-	۰	-	-	-
لرستان	لارو	۱۴	۱۲	۸۵/۷۱	۱	۷/۱۴	-
مازندران	اسپرم، تخمک و لارو	۳۵	۱۲	۳۴/۲۸	-	-	-
همدان	لارو	۱۱	-	۰	-	-	-
جمع کل		۲۱۴	۹۶	۴۵/۳	-	-	-

- = نتیجه آزمایش منفی می‌باشد.

استان‌های قزوین و اصفهان ۵۰ درصد بود، در حالی که استان‌های فارس، خراسان و سمنان از فراوانی نسبی پایین‌تر از ۳۰ درصد برخوردار بودند.

پراکنش بیماری در مناطق مختلف هر استان در جدول ۲ آمده است. همه نمونه‌های استان‌های لرستان، آذربایجان غربی و اردبیل مثبت بود. میزان فراوانی نسبی در

جدول ۲: درصد فراوانی نسبی (درصد) مناطق مختلف مبتلا به ویروس عامل نکروز عفونی پانکراس در هر استان

استان	منطقه	تعداد موارد مثبت به IPNV	تعداد موارد منفی به IPNV	فراوانی نسبی موارد مثبت (درصد)
آذربایجان شرقی	شبستر	۱	۴	۲۰
	مرند	۱	۲	۵۰
	هریس	۱	-	۱۰۰
	جمع کل	۳	۶	
آذربایجان غربی	اشنویه	۱	-	۱۰۰
	رشکند	۱	-	۱۰۰
	شفاف بالین	۲	-	۱۰۰
	قزل	۱	-	۱۰۰
	جمع کل	۵	-	
اردبیل	اردبیل	۳	-	۱۰۰
	جمع کل	۳	-	
اصفهان	سمیرم	۱	۱	۵۰
	مبارکه	۱	۱	۵۰
	جمع کل	۲	۲	
	دره چنار	۲	۱	۶۶/۶
چهار محال و بختیاری	دهنو	۱	۱	۵۰
	کوه‌رنگ	۳	۲	۶۶/۶
	جمع کل	۶	۴	
	ارمغان آب شرق	۲	۳	۳۳/۳
خراسان	خراسان شمالی	۲	۱۲	۱۴/۳
	جمع کل	۴	۱۵	
	سمنان	۱	۳	۳۳/۳
سمنان	جمع کل	۱	۳	
	دلخان	۲	۱	۶۶/۶
فارس	سپیدان	۲	۱۶	۱۱/۲
	سد رودزن	۱	۳	۳۳/۳
	جمع کل	۵	۲۰	
	اندج	۲	۲	۵۰
قزوین	خرم رود	۱	۱	۵۰
	شهرک	-	۲	
	جمع کل	۳	۵	

۵۴	۶	۷	بانه	کردستان
	۴	۱۱	پلنگان	
۱۰۰	-	۱	سیروان	
	۱۰	۱۹	جمع کل	
۶۶/۶	۱	۲	بریسه	کرمان
	۱	۲	جمع کل	
	۱	-	جواترود	کرمانشاه
	۱	-	سرپل زهاب	
۹۳/۳	۱	۱۴	شرکت زاگرس غرب	
	۱	-	صحنه	
۱۰۰	-	۱	کنگاور	
۱۰۰	-	۱	هرسین	
	۴	۱۶	جمع کل	
۵۰	۳	۳	کهگیلویه و بویر احمد	
	۳	۳	جمع کل	
۳۳/۳	۲	۱	ازنان	لرستان
۱۰۰	-	۳	الشر	
۱۰۰	-	۳	الیگودرز	
۱۰۰	-	۱	بروجرد	
۱۰۰	-	۱	خرم آباد	
۱۰۰	-	۳	رباط دواب	
	۱۲	۱۲	جمع کل	
۳۶/۳	۷	۴	آمل	
۵۰	۱	۱	اشکنه یال	
۱۰	۹	۱	تنکابن	
۶۶/۶	۱	۲	چالوس	
۳۳/۳	۲	۱	دو هزار	
۵۰	۱	۱	قزل پارک	
۳۳/۳	۲	۱	هراز	
	۲۳	۱۱	جمع کل	

بحث

بیماری IPN به عنوان یکی از بیماری‌های مهم ویروسی و با دامنه‌ی میزبانی وسیع در مناطق مختلف دنیا گسترش یافته و تاکنون موجب خسارات فراوانی به

موارد مثبت مربوط به نمونه‌های IHN شامل استان‌های فارس (۴٪)، لرستان (۷/۱۴٪) و آذربایجان شرقی (۲۲/۲٪) بود. به علاوه همه‌ی مناطق مورد نمونه‌گیری از نظر ویروس عامل VHS منفی بودند.

آکوابیروناویروس‌ها از جمله عامل IPN می‌تواند دارای دامنه‌ی وسیع‌تری از ماهیان آب شیرین و آب شور از جمله ماهیان زینتی باشد و از طرفی هر ساله میزان زیادی ماهیان زینتی آب‌های شیرین و شور وارد کشور می‌شود که احتمال انتقال ویروس IPN را با خود دارند. برای مثال در مطالعه‌ی Sang و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی ۷۸ گونه ماهیان زینتی وارداتی به ژاپن، متوجه موارد مثبت با درصد فراوانی نسبی ۳/۸۵٪ در سه گونه *Myliobatis Ostracion* و *Pseudanthias squamipinnis tobijei cubicus* شدند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ویروس عامل بیماری نکروز عفونی تقریباً در تمامی استان‌های کشور که از نظر فعالیت آبی‌پروری ماهیان سرد آبی (قزل‌آلا) فعال هستند، پراکنده شده است، به طوری که بیشترین موارد مثبت در برخی استان‌های حوزه‌ی زاگرس مانند آذربایجان غربی (۱۰۰٪)، لرستان (۸۵/۷۱٪)، کرمانشاه (۸۰٪)، کردستان (۶۴/۲۸٪) و چهار محال بختیاری (۶۰٪) ردیابی شده است. در مطالعه‌ی Raissy و همکاران در سال ۲۰۱۰ استان‌های چهار محال و بختیاری با فراوانی نسبی ۳۳/۳٪ و کهگیلویه و بویر احمد با فراوانی نسبی ۲۸/۵٪ را برای حضور عامل IPN مثبت تشخیص داده شدند. هم‌چنین در مطالعه‌ی مشابه توسط فدایی‌فرد و همکاران در سال ۱۳۹۱ روی تخم‌های خارجی و ایرانی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان چهار محال و بختیاری متوجه شدند که ۲۳/۳٪ نمونه‌های تخم آلوده به عامل بیماری IPN بودند. یکی از دلایل اصلی این امر تعداد مزارع بیشتر و بالطبع فعالیت بیشتر آبی‌پروری ماهیان سردآبی در این مناطق است هم‌چنان که استان‌های چهار محال و بختیاری و لرستان از نظر میزان تولید قزل‌آلا دارای مقام‌های اول و دوم در کشور هستند، بنابراین در این استان‌ها عملیات واردات تخم چشم زده از خارج از کشور یا سایر استان‌ها، عملیات جا به جایی و ورود بچه ماهی و احتمالاً مولدین به مراتب بیشتر از سایر استان‌های کشور صورت می‌گیرد. از آن جایی که این

صنعت آبی‌پروری به ویژه ماهیان سردآبی از جمله قزل‌آلا شده است (Raissy et al. 2010). از جمله علل عمده‌ی پراکنش وسیع و نیز سریع بیماری در دهه‌ی اخیر می‌توان به انتقال عمودی بیماری، تجارت حجم وسیعی از تخم چشم زده‌ی گونه‌های حساس مانند قزل‌آلا و مقاومت نسبی ویروس عامل بیماری‌زا به برخی عوامل محیطی مانند افزایش درجه‌ی حرارت اشاره نمود. در ارتباط با صنعت آبی‌پروری ماهیان سرد آبی یعنی صنعت قزل‌آلا در ایران نیز با توجه به توسعه‌ی این صنعت طی دو دهه‌ی اخیر و حجم وسیع واردات تخم چشم زده از کشورهای مختلف اروپایی (فرانسه، دانمارک، آلمان، آمریکا، کانادا و استرالیا) و از طرفی حجم وسیع جابجایی تخم چشم زده و بچه ماهیان در داخل کشور بروز بیماری با تلفات قابل توجه طی سال‌های گذشته همواره از جمله گزارشات و نگرانی‌های مزرعه‌داران کشور بوده است. به طوری که در سال ۱۳۸۲ میزان تلفات بچه ماهیان در برخی استان‌های پر تولید مانند چهار محال و بختیاری و مازندران به ترتیب ۱۹ و ۱۲ میلیون بچه ماهی رسید (آمار سازمان شیلات ایران و سازمان دامپزشکی کشور ۱۳۸۳) به هر حال با توجه به تشخیص بیماری IHN در مزارع قزل‌آلای کشور (Fallahi et al. 2006) و نیز بررسی پراکنش آن در سال‌های بعد (KhibanianAsl et al. 2008, Zargar et al. 2007) و با توجه به این که علائم بالینی، سن ابتلا و تأثیر عوامل محیطی، بر شدت تلفات در هر دو بیماری IHN و IPN در قزل‌آلا مشابه می‌باشد، لذا طی دهه‌ی گذشته عمدتاً تصور بر این بوده است که عامل اصلی و عمده‌ی تلفات دوران لاروی و بچه ماهی صنعت قزل‌آلای کشور ناشی از بیماری IHN می‌باشد. به هر حال با توجه به گزارش‌های اولیه از وجود موارد مثبت به IPNV در برخی از مزارع قزل‌آلا کشور طی سال‌های اخیر و نظر به مقاومت بالاتر ویروس در منابع آبی و مزارع قزل‌آلای کشور، پراکنش این بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور مورد توجه قرار گرفته است (Akhlaghi and Hosseini 2007, Raissy et al. 2010). علاوه بر این

۲۰۰۳ روی میزان پراکنش ویروس عامل IPN در مزارع ماهیان آزاد اطلس (*Salmo salar*) اسکاتلند طی سال‌های ۲۰۰۱-۱۹۹۶ نشان داد که بیماری در مزارع ماهیان دریایی و آب شیرین به ترتیب از رشد سالانه ۱۰ و ۳-۲ درصد برخوردار بوده است. لذا همگی این مطالعات بیانگر گسترش روز افزون بیماری IPN در جهان است.

در ارتباط با روش‌های تشخیصی بیماری نیز امروزه از روش‌های مولکولار RT-PCR به عنوان یکی از حساس-ترین آزمایش‌های تشخیصی سریع استفاده می‌شود (Akhlaghi and Hossieni 2007) به طوری که این روش به عنوان روش توصیه شده توسط OIE می‌باشد. لذا با توجه به این که نمونه‌های اخذ شده از این مطالعه همگی از موارد تلفات و با علائم بالینی بی‌حالی، سیاه شدن پوست، کم اشتها، آگزوفتالمی و در مواردی وجود قالب‌های مدفوعی در ناحیه‌ی مخرج اخذ شده است و از طرفی با توجه به موارد اندک مثبت ویروس عامل IHN که شامل ۴ نمونه بوده است و موارد منفی عامل VHS، موارد قابل توجه تلفات حاصله از این گونه مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل‌آلا می‌توان به بروز بیماری IPN نسبت داد. در ارتباط با نژادهای ویروس عامل بیماری IPN در مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور مطالعه‌ای صورت نگرفته است و لذا شناخت سروتیپ‌های احتمالی این ویروس نیازمند مطالعات آتی می‌باشد.

در جمع‌بندی و نتیجه‌گیری کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری IPN در تمامی استان‌های پر تولید قزل‌آلای کشور گسترش یافته و مزارع استان‌هایی با تولید بالاتر مانند لرستان، کردستان، چهار محال و بختیاری و مازندران از ابتلای بالاتری برخوردارند. عواملی مانند عدم رعایت قرنطینه، واردات تخم چشم زده در حجم بالا، جا به جایی بالای میزان تخم چشم زده‌ی تولید داخل و نیز جا به جایی میزان بالای بچه ماهیان، عدم آزمایشات لازم روی مولدین قبل از تخم کشی و نیز مقاومت جنس ویروس به برخی از عوامل محیطی مانند افزایش درجه حرارت آب، همگی موجب گسترش سریع بیماری در

گونه فعالیت‌های آبی‌پروری موجب پراکنش سریع‌تر عوامل عفونی از جمله ویروس IPN می‌شود، لذا از موارد پراکنش بیش‌تری نیز برخوردارند. به علاوه موارد مثبت به IPN در برخی استان‌های شمالی کشور نظیر مازندران که از شرایط مشابه حوزه‌ی زاگرس برخوردار است، به علت تراکم بالای مزارع قزل‌آلا در مسیر جاده‌ی هراز (بیش از ۳۰ مزرعه‌ی فعال در این منطقه وجود دارد) و حجم بالای عملیات واردات تخم چشم زده، بچه ماهی و نیز سایر فرآورده‌های مرتبط با صنعت مانند غذا، منطقه‌ی مذکور شاهد یکی از کانونی بیماری‌های عفونی از جمله IPN تبدیل گردیده است. به طوری که عامل بیماری IHN نیز اولین بار در کشور از این منطقه جداسازی و تشخیص داده شد (Fallahi et al. 2006). هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری به سایر استان‌های جنوبی کشور نظیر کرمان و فارس و نیز استان‌های شمال غربی مانند آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی و نیز مناطق نزدیک به مرکز مانند قزوین سرایت کرده است که به علت واردات تخم چشم زده و بچه ماهی از سایر استان‌های پر تولید و آلوده و یا واردات مستقیم از خارج از کشور می‌باشد. علت عدم تشخیص بیماری در برخی از استان‌ها مانند گیلان، گلستان و همدان نیز می‌تواند، ناشی از حجم کم نمونه‌برداری و یا فعالیت کم آبی-پروری سردآبی در این استان‌ها باشد که نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. مطالعات مشابه پیرامون پراکنش ویروس عامل بیماری IPN در سایر کشورها انجام گرفته است که بیانگر گسترش قابل توجه بیماری در مزارع ماهیان سردآبی در سایر کشورها است. برای مثال بررسی بیماری در تعدادی از مراکز تکثیر عمده‌ی ایرلند که واردات تخم چشم زده از اسکاتلند داشته‌اند، بیانگر ابتلای همگی آن‌ها به این بیماری بوده است (Anon 2003). در نورژ بیماری در مزارع متعددی پراکنده و به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی است که هر ساله حدود ۵/۵ میلیون یورو به صنعت آزادماهیان خسارات وارد می‌نماید (Skjelstad et al. 2003). در مطالعه‌ی Murray و همکاران در سال

ماهی تا ۵ گرمی از بروز خسارات ناشی از این بیماری جلوگیری نمایند. اگرچه واکنش‌هایی علیه این بیماری در سطح تجاری قابل دسترس است اما تا کنون واکنش رضایت‌بخش با کارآیی بالا و هزینه قابل قبول به بازار نیامده است (Skjesol et al. 2011) و لذا موضوع پیشگیری بیماری به روش واکنش‌ناسیون یکی از نیازهای تحقیقاتی آتی صنعت است. به علاوه در مورد تنوع سویه‌های ویروس عامل بیماری در کشور هیچ گونه اطلاعی در دست نیست. لذا این موضوع در حال تحقیق و مطالعه می‌باشد.

مزارع قزل‌آلای کشور شده است. از آن جایی که بیماری بیش‌ترین خسارات را در مرحله بیجه ماهی وارد می‌نماید و در این مرحله بیجه ماهیان از قدرت سیستم ایمنی کافی برخوردار نمی‌باشند، لذا توصیه می‌شود تا پرورش دهندگان با بهبود شرایط قرنطینه، توجه به دستورالعمل‌های بهداشتی سازمان دامپزشکی و کارشناسان بهداشتی، غربالگری مولدین در مراکز تکثیر برای شناسایی و حذف مولدین حامل، استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره‌ی غذایی دوران لاروی و بیجه ماهی، کنترل تراکم و بهبود کیفیت آب به ویژه در مراحل لاروی و بیجه

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران، قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران صورت گرفته است. هم‌چنین از همکاری‌های دفتر بهداشت و مبارزه با بیماری‌های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور تقدیر و تشکر می‌نماید.

منابع

- aquatic birnavirus isolates from Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28:169-174.
- Fallahi, R.; Soltani, M.; Zorrieh Zahra, M.E.J. and Hemmatzadeh, F. (2006). Serological diagnosis of infectious haematopoietic necrosis disease (IHN) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using indirect fluorescent antibody test. *Journal of Veterinary Research*, 61:15-19.
- Joh, S.J.; Kim, D.W.; Kim, J-H. and Heo, G-J. (2000). Detection of marine birnavirus (MBV) from rockfish *Sebastes schlegeli* using reverse transcription and nested PCR. *The Journal of Microbiology*, 260-264.
- Khiabani Asl, A.H.; Soltani, M.; Kazemi, B.; Sohrabi Haghdoost, I. and Sharifpour, I. (2007). Use of immunohistochemical and PCR methods in diagnosis of infectious haemopoirtic necrosis disease in some rainbow trout hatcheries in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 230-234.
- McAllister, P.E.; Schill, W.B.; Owens, W.J. and Hodge, D.L. (1993). Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: a study of clinical samples and processing methods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15:157-162.
- فدایی فرد، فیروز؛ رئیس، مهدی؛ مومنی، منوچهر و فغانی، مصطفی (۱۳۹۱). بررسی آلودگی تخم‌های قزل‌آلای رنگین کمان ایرانی و خارجی به ویروس‌های نکروز عفونی مراکز خون‌ساز، سپتیس سمی خونریزی دهنده ویروسی و نکروز عفونی لوزالمعده: یک مطالعه مقطعی، مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۷، شماره ۴، صفحات ۳۹۳-۳۹۹.
- Akhlaghi, M. and Hosseini, A. (2007). First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran, *Bulletin Archive- European Association of Fish Pathologists*, 27: 79-84.
- Anon. IPN in salmonids: a review. (2003). A report prepared by the Norwegian Seafood Federation (FHL) and VESO, 115pp.
- Bain, N.; Gregory, A. and Raynard, R.S. (2008). Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland, *Journal of Fish Diseases*, 31:37-47.
- Biering, E.; Melby, HP. and Mortensen, SH. (1997). Sero- and genotyping of some marine

- Milne, S.A.; Gallacher, S.; Cash, P. and Porter, A.J.R. (2006). A reliable RT-PCR-ELISA method for detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *Journal of Virology Methods*, 132: 92-96.
- Murray, A.G.; Busby, C.D. and Bruno, D.W. (2003). Infectious pancreatic necrosis virus in Scottish Atlantic salmon farms, 1996–2001, *Emerging Infectious Diseases* 9: 455–460.
- OIE. (2009). *Diagnostic Manual for Aquatic Diseases*, 6th ed. World Organization for Animal Health, Paris.
- Raissy, M.; Momtaz, H.; Ansari, M. and Moumeni, M. and Hosseinfard, M. (2010). Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in two major rainbow trout fry producing provinces of Iran with respect to clinically infected farms. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8 (3&4): 614-615.
- Roberts, R.J. and Pearson, M. D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Diseases*, 28: 383–390.
- Shin, S.P.; Gomez, D.K., Kim, J.H.; Choresca, Jr.C.H.; Han, J.E.; Jun, J.W. et al. (2011). Detection and genetic analysis of aquabirnaviruses in subclinically infected aquarium fish. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23:325–329.
- Skjelstad, B.; Brun, E. and Jensen, I. (2003). IPN in salmonids— a review. FHL Trondheim and VESO, Oslo, Norway.
- Skjesol, A.; Skjæveland, I.; Elnæs, M.; Timmerhaus, G.; Fredriksen, B.N.; Jørgensen, S.M. et al (2011). IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal*. 8: 396.
- Tafalla, C.; Rodriguez Saint-Jean, S. and Pérez-Prieto, S. (2006). Immunological consequences of the coinfection of brown trout (*Salmo trutta*) with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Aquaculture*, 266: 15-22.
- Taksdal, T.; Dannevig, B.H. and Rimstad, E. (2001). Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bulletin Archive-European Association of Fish Pathologists*, 21:214–219.
- 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: 4139-4141.
- Wolf, K.; Quimby, M.C.; Carlson, C.P. and Bullock, G.L. (1968). Infectious pancreatic necrosis: selection of virus-free stock from a population of carrier trout. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 25: 383-391.
- Zargar, A.; Soltani, M.; Hematzadeh, F.; Kazemi, B. and Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2008). Study on distribution of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in five major provinces producing rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) fry in Iran by indirect fluorescence antibody (IFAT) and nested-RT-PCR techniques. *Journal of Veterinary Research*, 63: 99-105.

Study of the distribution of infectious pancreatic necrosis (IPN) in rainbow trout farms of Iran using RT-PCR

Soltani, M.¹; Rouholahi, Sh.²; Zargar, A.³; Abdi, K.⁴; Mohamadian, S.² and Ghajari, A.⁵

Received: 16.02.2013

Accepted: 2.10.2013

Abstract

In this case-study, geographical distribution of infectious pancreatic necrosis (IPN) was studied in 18 provinces of Iran using RT-PCR during 2011-2012. Since the occurrence of coinfection by IPNV, infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) with the same clinical signs can occur, all samples were tested for presence of these three virus agents. Samples of larva and juveniles from rainbow trout with clinical signs such as anorexia, exophthalmia; darkened skin and high mortality as well as sperms and oval samples were obtained. Results showed that from 214 pooled samples, 96 (44.85%) in 15 provinces were positive for IPN. The highest relative frequency was observed in Lorestan, Isfahan, Chaharmahal va Bakhtiyari, Fars, Kermanshah, Kohgilouye va Boyerahmad, Mazandaran and Qazvin. These results show that IPN disease is distributed in north, western north, west, western south and south parts of country. Therefore it is important to improve the preventive criteria to decrease the economical losses due to the disease morbidity and mortality in farmed trout in Iran.

Key word: Infectious pancreatic necrosis, Infectious hematopoietic necrosis virus, Viral hemorrhagic septicaemia virus, RT-PCR

1- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

2- PhD Student of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

4- Aquatic Animal Health Specialist, Investigation and Management Office of Aquatic Animal Health, Veterinary Organization of Iran

5- Expert in Investigation and Management Office of Aquatic Animal Health, Veterinary Organization of Iran

Corresponding Author: Soltani, M., E-mail: msoltani@ut.ac.ir