Archive of SID

همایش ملی علوم جانوران آبزی
رشت، دانشگاه گیلان
شهریور ۱۳۹۲

بررسی عفونت‌زایی رابدوویروس عامل ویرمی بهاره کپور در ماهی سفید از طریق مواجه‌سازی گوارشی و انتقال افقی

حجت‌اله زمانی آلمانی[۱،*]، محدث قاسمی[۲]، سید مسعود حسینی[۳] و سمیه حقیقی کارسیدانی[۴]

۱و*-نویسنده مسوول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران (*h_zamani@sbu.ac.ir*)

۲- بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندر انزلی، گیلان

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

۴- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر انزلی

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی قابلیت عفونت و بیماریزایی رابدوویروس عامل ویرمی بهاره کپور (SVCV) در ماهی سفید از طریق مواجه سازی تجربی انجام پذیرفت. در این مطالعه ماهی سفید به صورت تجربی و به دو روش انتقال افقی و انتقال گوارشی با SVCV مواجه سازی گردید. جهت انجام مواجه سازی به روش انتقال افقی، در هر آکواریوم سه ماهی به صورت درون صفاقی با محیط کشت حاوی ویروس، تزریق شده و به آکواریوم حاوی ماهیان سالم افزوده شدند. برای انجام مواجه سازی گوارشی، ماهیان به صورت انفرادی با گرانول‌های غذایی آغشته به محیط کشت حاوی ویروس تغذیه شده و سپس به آکواریوم‌های مربوطه منتقل گردیدند. تمامی ماهیان به مدت شش هفته از نظر بروز علائم بالینی بررسی شده و در صورت بروز تلفات، جهت بررسی‌های آسیب شناسی بافتی و آزمایش مولکولی RT-PCR نمونه برداری شدند. ماهیان بقا یافته در پایان دوران مواجه سازی نیز جهت انجام آزمایش RT-PCR نمونه‌برداری شدند. نتایج نشان داد که ماهی سفید نسبت به SVCV حساس بوده و میزان بروز بیماری و تلفات بستگی به مسیر انتقال عفونت دارد. بر اساس نتایج، مواجه سازی به روش انتقال افقی منجر به ۶۰٪ و مواجه سازی گوارشی منجر به کمتر از ۱۰٪ تلفات گردید. در بررسی‌های هیستوپاتولوژی، آسیب‌های بافتی در آبشش‌ها، کبد، کلیه و طحال دیده شد که آسیب های بافت آبشش شدیدتر از سایر اندام‌ها بود. علاوه بر این، نتایج RT-PCR بافتی ماهیان تلف‌شده و بقاء یافته نشان داد که ماهی سفید نه تنها می‌تواند به عنوان حامل SVCV مطرح باشد بلکه به عنوان میزبان حساس به ویروس نیز محسوب می‌گردد.

کلمات کلیدی: ویرمی بهاره، عفونت‌زایی، ماهی سفید، SVCV

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویرمی بهاره کپور ماهیان (Spring Viremia of Carp) یک بیماری به شدت مسری در بسیاری از کپور ماهیان (*cyprinidae*) و گونه‌های مرتبط با آنان می‌باشد به طوریکه میزان مرگ و میر ناشی از آن گاهی تا ۷۰٪ گزارش شده است (Ahne *et al*., 2002). عامل این بیماری ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) بوده که در خانواده ویروسی رابدو ویریده قرار دارد. این بیماری معمولاً در فصل بهار، زمانی که دمای آب بین ۱۰ تا ۱۵°C است، دارای بیشترین موارد شیوع می‌باشد. گزارش‌های متعددی از شیوع این بیماری در اروپا شامل انگلستان، روسیه، بلاروس، گرجستان و سایر کشورهای اروپای شرقی (OIE, 2012) وجود دارد. علاوه بر این، شیوع این بیماری در آمریکا (Dikkeboom *et al*., 2004) و ایران (Haghighi *et al*., 2008) نیز گزارش گردیده است.

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) از ماهیان ارزشمند دریای خزر و مناطق آبی اطراف آن می‌باشد و سالانه بخش عمده‌ای از صید ماهیان خزری را به خود اختصاص می‌دهد(صالحی، ۱۳۸۱). این ماهی از لحاظ فیلوژنی در خانواده کپور ماهیان قرار دارد و با توجه به اینکه بسیاری از کپور ماهیان نسبت به SVCV حساس می‌باشند، بررسی میزان حساسیت این ماهی نسبت به SVCV به منظور به کارگیری امکانات و استراتژی های پیشگیرانه و درمانی موثر در صنعت پرورش ماهی سفید، منطقی به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش بررسی قابلیت عفونت و بیماریزایی ویروس ویرمی بهاره کپور ماهیان در ماهی سفید خزری از طریق مواجه‌سازی گوارشی ویروس و همچنین انتقال افقی ویروس از ماهیان آلوده به ماهیان سالم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق سویه ویروسی SVCV ۵۶/۷۰ با شماره ثبت ژن Z۳۷۵۰۵/۱، که از آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا (EURL) واقع در کشور دانمارک تهیه گردید، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تکثیر ویروس از تیره سلولی EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprinid*) و محیط EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) استفاده گردید. پس از تزریق ویروس به محیط کشت سلولی و مشاهده آثار آسیب سلولی ناشی از تکثیر ویروس، محیط EMEM حاوی ویروس پس از سانتریفوژ جهت انجام مواجه سازی مورد استفاده قرار گرفت . تیتراسیون ویروس نیز از طریق تعیین $TCID_{50}$ به روش رقیق سازی سریالی در پلیت های ۹۶ خانه انجام پذیرفت (Reed and Muench, 1938).

در این تحقیق از بچه ماهیان سفید با وزن تقریبی ۳ گرم استفاده گردید که از مرکز بازسازی و تکثیر ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ماهیان در آکواریوم‌های ده لیتری با تراکم ده ماهی در هر آکواریوم، با دمای آب ۱۷°C-۱۵ و جریان هوادهی ممتد تقسیم شده و جهت تطابق با محیط آزمایشگاه به مدت ۲۰ روز نگهداری و تغذیه گردیدند . به منظور انجام مواجه سازی، آکواریوم‌ها به دو تیمار مواجه سازی گوارشی ویروس و مواجه سازی به روش انتقال افقی و در دو تکرار دسته بندی گردیدند و برای هر یک از تیمارها یک آکواریوم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. جهت انجام مواجه سازی گوارشی گرانول‌های غذای ماهیان به مدت یک دقیقه در محیط کشت EMEM حاوی ویروس با غلظت $۶/۵ \times ۱۰^{۵} TCID_{50}/mL$ قرار داده شدند و سپس ماهیان به صورت انفرادی با غذای آلوده به ویروس تغذیه شدند و ماهیان کنترل منفی با غذای آغشته به محیط EMEM فاقد ویروس تغذیه شدند. جهت انجام مواجه سازی به روش انتقال افقی ویروس، در هر آکواریوم سه ماهی به میزان ۱۰ میکرو لیتر با محیط EMEM حاوی ویروس با غلظت $۶/۵ \times ۱۰^{۵} TCID_{50}/mL$ و به صورت درون صفاقی تزریق شده و پس از علامت گذاری به هفت ماهی سالم موجود در آکوا ریوم‌های مربوطه افزوده شدند. در آکواریوم کنترل منفی نیز سه ماهی با حجمی مشابه از محیط EMEM فاقد ویروس تزریق شده و به سایر ماهیان افزوده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

همه ماهیان به مدت هفت هفته از لحاظ تغییرات رفتاری و علائم بیماری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند و به محض بروز تلفات نمونه برداری شدند. به منظور انجام آزمایش هیستوپاتولوژی، پس از آماده سازی بافت و از قالب گیری، بلوک‌های تهیه شده با ضخامت برش ۴ میکرومتر برش گیری شده و پس از انتقال به روی لام با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ آمیزی گردیدند.

جهت بررسی حضور ویروس در بافت ماهیان تلف شده و بقا یافته ، از تکنیک مولکولی RT-PCR استفاده گردید. استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNeasy و طبق دستورالعمل سازنده کیت (شرکت Qiagen) انجام پذیرفت و پس از استخراج، RNA کل توسط اتانل و با استفاده از ستون‌های فیلتردار رسوب دهی گردید. آزمایش RT-PCR نیز با استفاده از کیت یک مرحله‌ای Qiagen انجام پذیرفت. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش بر اساس توالی نوکلئوتیدی ۸۳۵-۸۱۴ و ۱۲۸۳-۱۲۶۲ ژن گلیکوپروتئین G ویروس انتخاب شدند(Koutna, 2003). مراحل انجام RT-PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bioer XP cycler) انجام پذیرفت. مخلوط واکنش‌ها جهت ساختن cDNA ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰°C و سپس به مدت ۳ دقیقه در ۹۴°C گرما گذاری شدند. در مرحله بعد ۳۵ سیکل PCR که هر سیکل شامل مرحله واسرشت (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال (Anealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰°C و مرحله ساخت (Polymerization) به مدت یک دقیقه و در دمای ۷۲°C بود، اجرا گردید و مرحله پایانی واکنش به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۷۲°C انجام پذیرفت. در نهایت محصول ۴۷۰ جفت بازی RT-PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و زیر نور UV آشکارسازی شد.

نتایج و بحث

اولین علائم بیماری در روز ۱۶ پس از مواجه سازی و در تیمار انتقال افقی مشاهده گردید. مهمترین علائم بالینی مشاهده شده شامل بی اشتهایی، تیرگی بدن، بیرون‌زدگی چشم‌ها، شنای غیرعادی، وارونگی و خونریزی‌های زیر جلدی در ناحیه شکمی بود. این در حالی است که علائم بالینی چندانی تا پایان دوران مواجه سازی در تیمار مواجه سازی گوارشی دیده نشد . اولین تلفات در ماهیان این تیمار در روز ۲۰ پس از مواجه سازی مشاهده گردید و به مدت یک هفته ادامه یافت به طوریکه طی این مدت ۶۰٪ ماهیان این تیمار دچار تلفات شدند. بروز تلفات در تیمار مواجه سازی گوارشی بدون علائم و تنها در روز ۲۳ پس از مواجه سازی دیده شد به طوریکه کمتر از ۱۰٪ ماهیان این تیمار تلف شدند. همچنین هیچگونه تلفاتی در ماهیان کنترل منفی تا پایان دوران مطالعه مشاهده نشد.

بررسی‌های هیستوپاتولوژی بر روی اندام‌های ماهیان نشان دهنده وجود التهاب و آسیب‌های بافتی خفیف تا شدید در بافت‌های مورد مطالعه بود. این آسیب‌ها در همه ماهیان تلف شده دیده شد و از این نظر ارتباطی با تیمار مورد مطالعه نداشت. شدیدترین آسیب‌های بافتی در آبشش‌ها مشاهده شد که شامل تغییرات شکلی و تحلیل رفتن تیغه‌های آبششی و چسبندگی لاملاهای ثانویه بود. بررسی آسیب شناسی سایر بافت‌ها حاکی از وجود پرخونی و نکروز سلولی در بافت کبد، ادم و افزایش فضای اطراف گلومرول های کلیه و بروز واکوئلاسیون در بافت طحال بود (شکل ۱). آسیب‌های بافتی مشاهده شده از بسیاری از جهات مشابه آسیب‌های بافتی گزارش شده در سایر ماهیان خانواده *cyprinidae* مبتلا به ویرمی بهاره کپور ماهیان می‌باشد (Haenen and Davidse, 1993).

آزمایش RT-PCR بر روی نمونه‌های تهیه شده از اندام‌های داخلی ماهیان تلف شده و بقا یافته هر دو تیمار و ماهیان کنترل منفی انجام پذیرفت. بر اساس نتایج، باند ۴۷۰ جفت بازی محصول RT-PCR در ماهیان تلف شده هر دو تیمار مشاهده گردید. از سوی دیگر نتایج نشان دهنده وجود ژنوم ویروسی در برخی از ماهیان بقا یافته تیمار انتقال افقی بود. انجام این آزمایش بر روی ماهیان کنترل منفی و ماهیان بقا یافته تیمار مواجه‌سازی گوارشی هیچگونه باندی در ناحیه ۴۷۰ جفت بازی نشان نداد(شکل ۲).

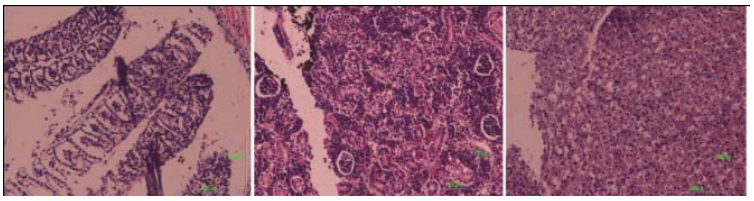
بر اساس نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که ماهی سفید خزری نسبت به عفونت با SVCV حساس بوده و این حساسیت به میزان زیادی بستگی به مسیر ورود ویروس دارد. مواجه سازی به روش انتقال افقی به عنوان طبیعی‌ترین نحوه انتقال عفونت SVCV منجر به بیماری و در نتیجه تلفات بالاتری در ماهی سفید خزری در مقایسه با تیمار مواجه سازی گوارشی گردید($p<0/05$). به نظر می‌رسد در

www.SID.ir

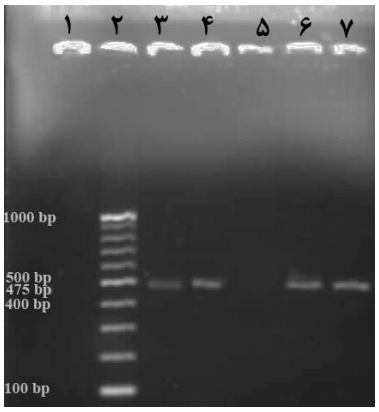
Archive of SID

تیمار انتقال افقی، SVCV قادر به بقا و تکثیر در بدن ماهیان تزریق شده بوده و با ترشح از طریق مخاط و مواد دفعی ماهی ان آلوده به محیط آبی آزاد می‌گردد. در چنین شرایطی کل پیکره ماهی در تماس با ویروس بوده و امکان سرایت عفونت از م سیرهای مختلف شامل مخاط آبشش، دهان و پوست وجود دارد . در مقابل، در تیمار مواجه سازی گوارشی مسیر انتقال ویروس تنها به مسیر گوارشی محدود گردیده و به نظر می رسد امکان تثبیت عفونت و بروز بیماری کاهش یافته و بیماری سیر پیشرفت آهسته تری به خود می گیرد (Schonherz *et al*., 2012).

نتایج آزمایش RT-PCR بر روی ماهیان تلف شده هر دو تیمار، نشان دهنده وجود عفونت SVCV و در نتیجه بیماری ناشی از آن به عنوان عامل بروز بیماری و تلفات بود. از سوی دیگر نتایج RT-PCR وجود اسیدنوکلئیک ویروس در ماهیان بقا یافته و به ظاهر سالم را در تیمار انتقال افقی تائید نمود. بنابراین به نظر می‌رسد که ماهی سفید خزری نه تنها می‌تواند به عنوان یک گونه از کپور ماهیان حساس به SVCV در نظر گرفته شود بلکه می‌تواند همانند بسیاری از کپو ر ماهیان دیگر به عنوان حامل ویروس مطرح بوده و عامل انتقال عفونت به جمعیت ماهیان سالم در نظر گرفته شود (OIE, 2012). از سوی دیگر، عدم شناسایی اسیدنوکلئیک ویروسی در ماهیان بقا یافته تیمار مواجه سازی گوارشی ممکن است به دلیل عدم قابلیت تثبیت و تکثیر SVCV در سیستم گوارشی ماهی و در نتیجه عدم وجود تیتر کافی ویروس جهت شناسایی باشد.



شکل ۱. آسیب‌های بافتی مشاهده شده در ماهیان بیمار مواجه سازی شده باSVCV (بزرگنمایی ۲۰ برابر). نکروز سلولی و واکوئلاسیون در بافت کبد (راست) ادم و گلومرونفریت در بافت کلیه (وسط)، تغییر شکل و چسبندگی تیغه‌های آبششی (چپ).



شکل ۲. نتایج آزمایش RT-PCR بر روی بافت ماهیان سفید تلف شده و بقا یافته پس از مواجه‌سازی با SVCV. ۱- کنترل منفی، ۲- مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی (Vinantis)، ۳- کنترل مثبت (سویه استاندارد SVCV)، ۴- ماهیان تلف‌شده تیمار مواجه‌سازی گوارشی، ۵- ماهیان بقا یافته تیمار مواجه‌سازی گوارشی، ۶- ماهیان تلف شده تیمار انتقال افقی، ۷- ماهیان بقا یافته تیمار انتقال افقی

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

صالحی. حسن.، (۱۳۸۱). تحلیل اقتصادی تولید و رهاسازی بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در ایران. مجله علوم دریایی ایران. دوره ۲. شماره ۱. ص ۳۵-۴۵.

Ahne, W., Bjorklund. H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. and Winton. J.R. 2002. Spring viremia of carp (SVC). Dis. aquat. Org. 52: 261–272.

Dikkeboom, A., Radi, C., Toohey-Kurth, K., Marcquenski, S., Engel, M., Goodwin, A.E., Way, K., Stone, D.M. and Longshaw, C. (2004). First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in north America. J. Aquat. Anim. Health 16, 169-178.

Haenen, 0. L. M. and Davidse, A. 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. Dis. aquat. Org. 15: 87-92.

Haghighi, A.,. Sharifnia, Z., Bandehpoor, M. and Kazemi, B. 2008. The first report of speing viremia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. AJAVA. 3:263-268.

Koutna, M., Vesely, T., Psikal, I. and Hulova, J.2003. Identification of spring viremia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. Dis. Aquat. Org. 55: 229-235.

Office International des Epizooties (OIE). 2012. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Pring viremia of carp. Chapter 2.3.8. pp: 357-373.

Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American Journal of Hygiene. 27: 493–497.

Schonherz, A., Hansen, A., Jørgensen, M. H. H., Berg, H. B. H., Lorenzen, P. N. and Einer Jensen, K. 2012. Oral transmission as a route of infection for viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 35: 395–406.

همایش ملی علوم جانوران آبزی
رشت، دانشگاه گیلان
شهریور ۱۳۹۲

www.SID.ir