مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۳، ۱۰۵-۹۹

مطالعه پراکنش بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز (IHN) در پنج استان عمده تولید کننده بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان کشور با استفاده از تکنیک‌های آنتی بادی درخشان به روش غیرمستقیم (IFAT) و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (nested-RT-PCR)

اشکان زرگر[۱] مهدی سلطانی[۱]* فرهید همت زاده[۲] بهرام کاظمی[۳] حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۱]

۱) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۲) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۳)مرکز بیوتکنولوژی زیستی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی.

(دریافت مقاله: ۹ اسفندماه ۱۳۸۴ ، پذیرش نهایی: ۲۷آبان ماه ۱۳۸۵)

چکیده

شناسایی مراکز تکثیرآلوده به ویروس بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز (IHN) در پنج استان عمده تولید کننده تخم چشم زده و بچه ماهی قزل الای رنگین کمان کشور شامل مازندران، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، لرستان و فارس با استفاده از تکنیک‌های IFAT و RT-PCR-nested ومقایسه این دو تکنیک با یکدیگر مورد مطالعه قرارگرفته است. بافت‌های کلیه، کبد وطحال بچه ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان طی شرایط استریل در محل مزارع جداسازی و نهایتا در فریزر ۷۰- درجه‌سانتیگراد نگهداری شد. به‌منظور افزایش اختصاصیت واکنش RT-PCR، یک واکنش ثانویه PCR-nested روی محصول اولیه انجام‌گرفت. پس از هشت ماه آزمایش‌های فوق الذکر مجددا روی نمونه‌های مثبت این مزارع تکرارشد تا حساسیت این دو روش در طی زمان برای نمونه‌های قدیمی مشخص‌گردد. نتایج حاصله نشان داد که تمامی پنج استان یادشده آلوده به ویروس IHN هستند (چهارده مزرعه از بیست و هفت مزرعه نمونه برداری شده). نتایج بدست‌آمده نشان داد که هر چند IFAT حساسیت قابل قبولی برای شناسایی IHNV در مراحل اول آلودگی از خود نشان می‌دهد با این وجود آزمایش nested-RT-PCR واجد توانایی بالاتر از RT-PCR وحساسیت بالاتری نسبت به IFAT بخصوص برای نمونه‌های نگهداری‌شده در فریزر به مدت چندین ماه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز، قزل آلای رنگین کمان، IHNV، nested-RT-PCR، IFAT.

مقدمه

بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز، رابدوویروسی متعلق به جنس نووی رابدوویروس یکی از مهمترین بیماری‌های صنعت پرورش آزادماهیان به شمار می‌رود. همه گونه‌های آزاد ماهیان از جمله قزل آلای رنگین کمان به‌ویژه در سنین لاروی و در درجه حرارت‌های ۱۴-۸ درجه سانتیگراد به این بیماری حساس بوده به طوری که منجر به تلفات سنگین حتی تا ۱۰۰درصد می‌شود. از آنجایی که بیماری به هر دو روش افقی و عمودی قابل انتشار بوده و نیز با توجه به اینکه بیشترین تلفات را در مراحل لاروی زمانی که واکنش‌های ایمونولوژیک از تکامل و رشد کافی برخوردار نبوده را موجب می‌شود(۹،۱۷، ۸). اعمال مقررات پیش‌گیری و قرنطینه از طریق بررسی‌های همه‌گیری شناسی بخصوص به‌کارگیری روش‌های تشخیصی حساس و حذف کانون‌های آلوده از اصول اولیه مبارزه با بیماری به شمار می‌روند. مطالعات اولیه سرولوژیک حاکی از موارد مثبت در برخی از مزارع قزل آلای رنگین کمان کشور به ویروس عامل این بیماری بوده است(۱) تا اینکه فلاحی و همکاران درسال۱۳۸۵(۷، ۶) طی مطالعه‌ای موفق به جداسازی و شناسایی ویروس عامل بیماری از برخی مزارع کشور شدند. با توجه به تلفات سنگین در مراکز تکثیر کشور، از طرفی و جداسازی و شناسایی ویروس عامل بیماری از طرف دیگر، ضرورت بررسی‌های سرولوژیک و ملکولی برای شناسایی مراکز آلوده از اهمیت بیشتری برخوردار می‌گردد. لذا این مطالعه در راستای مطالعات قبلی و با هدف ردیابی پادگنی و تشخیص ملکولی ویروس عامل بیماری در مزارع استان‌های عمده تولید کننده تخم چشم زده و بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان کشور انجام گرفته است، تا ضمن مقایسه دو روش سرولوژیک(آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم)و ملکولی(واکنش زنجیره‌ای پلی مراز)نسبت به شناسایی مراکز آلوده اقدام شود.

مواد و روش کار

نمونه برداری: طی مدت ۶ ماه از تمامی کارگاه‌های تکثیر قزل آلا واقع در استان‌های مازندران، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، لرستان و فارس نمونه برداری به عمل آمد.

نمونه برداری بر اساس پروتکل OIE(۱۱) از هر مزرعه و بر اساس میزان تولید تا سطح حداقل ۹۵درصد انجام گرفت به‌طوری‌که از هر مزرعه نیاز به اخذ ۱۵۰ نمونه بود. اما با توجه به حجم بالای نمونه‌ها و محدودیت‌های پیش بینی نشده سعی شد حداقل ۶۰ نمونه از هرمزرعه گرفته شود(جدول ۱).

نمونه برداری از اندام‌های کلیه، طحال و کبد بچه ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان و با احتساب هر ۵ قطعه بچه ماهی زیر گرم به عنوان یک نمونه انجام گردید. بدین صورت که پس از صید بچه ماهی‌ها، بلافاصله اندام‌های فوق الذکر جدا و داخل لوله اپندورف استریل قرار گرفته و در میان یخ پودر شده

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۲-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:msoltani@ut.ac.ir

جدول ۱: استان، زمان وتعداد نمونه‌های اخذ شده برای ردیابی پادگنی و تشخیص ملکولی عامل بیماری IHN (بجای اسامی مزارع از اعداد استفاده شده است).

ردیف	استان	زمان نمونه‌گیری	تعداد نمونه
۱	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۱۵۰
۲	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۷۵
۳	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۶۰
۴	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۱۵۰
۵	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	اسپرم و تخم(۲۷)
۶	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۵۵
۷	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۱۵۰
۸	چهارمحال و بختیاری	دی ماه ۱۳۸۳	۶۰
۹	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۶۰
۱۰	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۶۵
۱۱	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۵۵
۱۲	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۱۵۰
۱۳	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۶۷
۱۴	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۱۲۰
۱۵	مازندران	آبان ماه ۱۳۸۳	۷۰
۱۶	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۱۱۰
۱۷	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۶۰
۱۸	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۴۰
۱۹	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۵۳
۲۰	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۷۰
۲۱	کهگیلویه و بویراحمد	بهمن ماه ۱۳۸۳	۶۵
۲۲	فارس	بهمن ماه ۱۳۸۳	۱۲۰
۲۳	فارس	بهمن ماه ۱۳۸۳	۶۴
۲۴	فارس	بهمن ماه ۱۳۸۳	۶۱
۲۵	لرستان	دی ماه ۱۳۸۳	۶۷
۲۶	لرستان	دی ماه ۱۳۸۳	۷۰
۲۷	لرستان	دی ماه ۱۳۸۳	۶۵
	تعداد کل نمونه		۲۱۳۲

قرار داده می‌شد.

بلافاصله پس از اتمام نمونه برداری فلاسک حاوی یخ و نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی هر استان ارسال و در آنجا در فریزر ۲۰-درجه سانتیگراد نگهداری و روز بعد به آزمایشگاه تشخیص بیماری‌های گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل و در فریزر ۷۰-درجه سانتیگراد تا شروع عملیات آزمایشگاهی نگهداری می‌شد.

آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم (IFAT): این آزمایش براساس روش توصیه شده توسط OIE (۱۱) و به شرح ذیل انجام گرفته است:

پس از خروج نمونه از فریزر و رفع انجماد اقدام به تهیه گسترش فشاری (impression smear) بسیار نازک از نمونه‌ها گردید. گسترش‌های تهیه شده در دمای آزمایشگاه خشک شده و با استن سرد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت می‌گردید و نهایتا ۴ مرتبه با PBS-T شستشو می‌گردید. در این مرحله می‌توان نمونه‌های تثبیت شده را در سرمای ۲۰-درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

در مرحله بعد به میزان ۵۰ µl از محلول آنتی بادی منوکلونال موشی ضد IHNV (Aquatic diagnostic ltd.) که در PBS-T به میزان ۴۰ برابر رقیق شده است به نمونه اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می‌گردید و در پایان ۴ مرتبه با PBS-T شستشو داده می‌شد.

برای ردیابی پادتن‌های اتصالی به میزان ۱۰۰ µl از رقت ۱/۲۰ آنتی بادی بزی ضد موشی کنژوگه با FITC (SIGMA) روی هر کدام از نمونه‌ها ریخته شده و مجددا در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه گرمخانه گذاری می‌گردید. پس از ۴ بار شستشو با PBS-T با اضافه کردن یک قطره گلیسرول نمکی ۵۰ درصد رقیق شده در PBS اقدام به مشاهده نمونه توسط میکروسکوپ فلورسنت می‌گردید.

اضافه می‌نماید در تمام مراحل انجام آزمایش IFAT کنترل مثبت شامل لام‌های آماده و فیکس شده آلوده به ویروس IHN عرضه شده از سوی آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های شیرین روسیه و کنترل منفی تهیه شده از بافت ماهی سالم عاری از ویروس، استفاده شد.

آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (nested-RT-PCR):

الف- استخراج RNA ویروس از بافت مشکوک (برای استخراج RNA از کیت RNX-plus ساخت شرکت سیناژن استفاده گردید):

۱- هموژن‌کردن نمونه: قبل از استخراج RNA می‌بایستی نمونه به شکل هموژن درآید که بدین منظور نمونه به اندازه ۰/۵ سانتیمتر مکعب در هاون چینی سائیده می‌شد. سپس نمونه سائیده شده به لوله اپندورف محتوی ۲۰۰ µl RNX plus انتقال یافته و پس از چند ثانیه ورتکس به مدت یک شب در محیط آزمایشگاه انکوبه می‌شد. روز بعد ۱۰۰ µl کلرفرم به محلول حاوی بافت متلاشی شده افزوده و به آرامی آن را سروته نموده و پس از ۵ دقیقه سکون در محیط آزمایشگاه آن را با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶-۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ نموده و فاز روئی تشکیل شده حاوی RNA به لوله اپندورف ۰/۵ml انتقال داده می‌شد.

۲- رسوب RNA: به میزان دو برابر اتانل ۱۰۰ درصد (ذخیره شده در ۲۰-درجه سانتیگراد) و یا ایزوپروپانل (هم حجم) را به هر نمونه حاصل از مرحله قبل اضافه نموده و به آرامی سروته نموده تا به خوبی مخلوط و سپس با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶-۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و در پایان مایع روئی به آرامی حذف شده و رسوب RNA در کف لوله نگه داشته می‌شد.

در مرحله بعد به منظور حذف نمک‌های RNX plus به میزان ۱۰۰ µl اتانل ۷۰ درصد به نمونه اضافه و سپس مجددا در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه در دمای ۶-۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می‌شد. سپس اقدام به حذف الکل و نگهداری لوله به صورت وارونه به مدت ۲۰ دقیقه بر روی کاغذ صافی نموده تا RNA حاصله تقریبا خشک شود.

۳- شستشوی RNA: ۱۰۰-۵۰ µl آب حاوی دی استیل

جدول ۲: نتایج آزمایش IFAT در ۵ استان (بجای اسامی مزارع از اعداد استفاده شده است).

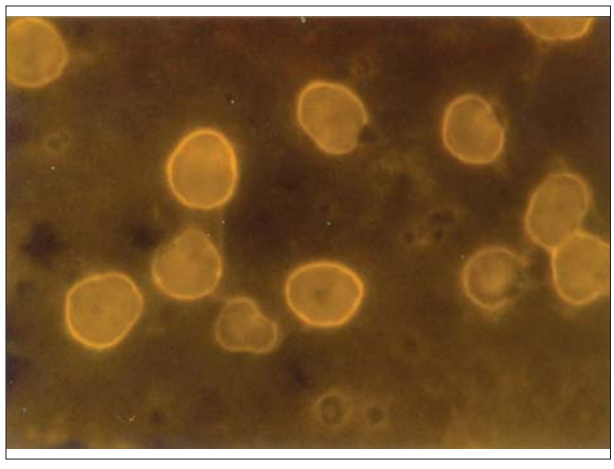
ردیف	استان	IFAT	درصد	IFAT بعداز ۸ ماه
۱	چهارمحال و بختیاری	۱۲۳/(۱۵۰)	۸۲	
۲	چهارمحال و بختیاری	-		
۳	چهارمحال و بختیاری	-		
۴	چهارمحال و بختیاری	-		
۵	چهارمحال و بختیاری			
۶	چهارمحال و بختیاری	-		
۷	چهارمحال و بختیاری	-		
۸	چهارمحال و بختیاری	-		
۹	مازندران	۶۰/(۶۰)	۱۰۰	
۱۰	مازندران	-		
۱۱	مازندران	-		
۱۲	مازندران	۷۳/(۱۵۰)	۴۹	
۱۳	مازندران	۵۹/(۶۷)	۸۸	۴/(۵۹)(۷درصد)
۱۴	مازندران	۸۹/(۱۲۰)		
۱۵	مازندران	-		
۱۶	کهگیلویه و بویراحمد	۹۱/(۱۱۰)	۸۲	۱۳/(۹۱)(۱۲درصد)
۱۷	کهگیلویه و بویراحمد	-	۰	
۱۸	کهگیلویه و بویراحمد	۲۵/(۴۰)	۶۳	
۱۹	کهگیلویه و بویراحمد	-	۰	
۲۰	کهگیلویه و بویراحمد	۵۵/(۷۰)	۷۹	
۲۱	کهگیلویه و بویراحمد	-	۰	
۲۲	فارس	۹۷/(۱۲۰)	۸۱	
۲۳	فارس	۶۴/(۶۴)	۱۰۰	۱۰/۶۴(۱۵درصد)
۲۴	فارس	-	۰	
۲۵	لرستان	-	۰	
۲۶	لرستان	۴۷/(۷۰)	۶۷	
۲۷	لرستان	۸/(۶۵)	۱۲	
تعداد کل نمونه		۷۹۱/(۲۱۳۲)	۳۷	

پیروکربنات(DEPC water)و SDS ۰/۵درصد و یا EDTA 1mM با pH۷ به لوله حاوی RNA به منظور حل نمودن و حفظ RNA استخراجی(ممکن است یک انکوباسیون به مدت ۱۰دقیقه در ۶۰درجه سانتیگراد برای حل شدن RNA نیاز باشد)اضافه نموده سپس لوله اپندورف در بن ماری ۷۰درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به منظور باز شدن لوپ RNA قرارداده می‌شد.

۴- انجام آزمایش استخراج RNA: میزان ۱۰µl از نمونه را بر روی ژل آگارز ۲-۱درصد بارگیری نموده(۸۰ولت، ۴۰آمپر)، rRNA به صورت باند بالای رنگ بوده و بقیه RNAها شامل RNA سلولی و ویروسی جلوتر از رنگ مشخص می‌گردید.

ب- تهیه DNA مکمل(cDNA): برای انجام مرحله RT با حجم نهایی ۲۰µl به شرح زیر عمل شد:

میزان ۳µl از RNA استخراج شده را با ترکیبی از مواد شامل ۲µl primer IHN R1، ۰/۵µl dNTPs، ۰/۵µl M-MuLV RT(200 IU/µl)، ۱۰µl Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)water، ۴µl 5X buffer مخلوط کرده سپس به مدت یک ساعت در ۴۲درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۹۵-۶۵درجه



تصویر ۱- سلول‌های کبدی آلوده به ویروس IHN مشاهده شده در آزمایش IFAT(بزرگنمایی ۴۰۰×).

سانتیگراد(جهت غیرفعال کردن آنزیم RT)قرارداده می‌شد تا cDNA تهیه شود.

ج- مرحله اول PCR: به منظور انجام آزمایش nested-RT-PCR برای تشخیص IHNV دو سری پرایمر از روی سکانس ژنی متعلق به پروتئین G ویروس موجود در بانک ژنی به شماره ACCESSION AY331666 به شرح ذیل طراحی گردید:

Outer primers (first PCR) :

IHN F :5- 5`- CAT CTG CTC AAC AGG GTT CTT C -3` (309-330)

IHN R 5`- AGT CTT GTC CTC ACA CTT CGA G - 3` (831-852)

Size of products :543 bp

Inner primers (nested PCR):

IHN2 F 5` - AGA CGA TAG AGA AGG CGC TT - 3` (338 - 357)

IHN2 R 5` - GAT TTC TGC TCC AGA ATT GT - 3 (803 - 822)

Size of products :484 bp

برای انجام یک واکنش RT-PCR با حجم ۳۰µl از مخلوطی به شرح زیر استفاده شد:

۳µl 10X PCR buffer، ۳µl $MgCl_2$ (25 mM)، ۳µl dNTPs(2 mM)، ۱/۵µl از پرایمر IHN-F (20 pmoles/µl)، ۱/۵µl از پرایمر IHN-R (20 pmoles/µl)، ۰/۳-۱µl Taq DNA polymerase، ۵µl cDNA، ۱۲/۷-۱۲µl آب مقطر دوبار تقطیر.

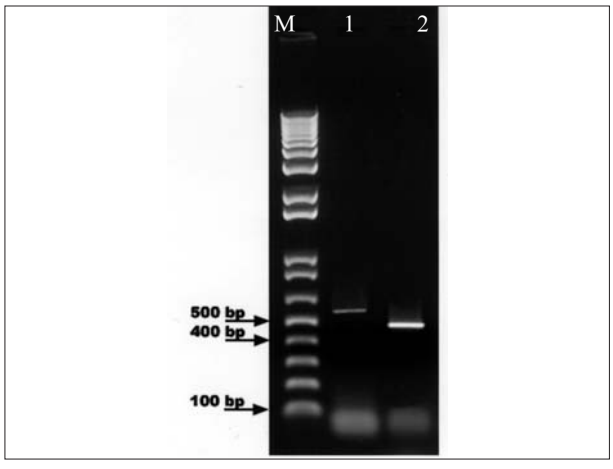
پس از آماده سازی مخلوط فوق بر اساس برنامه شماره ۱ شامل مرحله آغازین(۵min/ ۹۴درجه سانتیگراد)، ۳۰ تکرار شامل مراحل واسرشتگی(۹۴/۳۰sec درجه سانتیگراد)، هم سرشتگی(۳۰sec/ ۶۳درجه سانتیگراد)، بسط(۳۰sec / ۷۲درجه سانتیگراد) و در پایان مرحله بسط نهایی(۷۲/۵min درجه سانتیگراد)نسبت به انجام واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Endurance TC-412 TECHNE ساخت آمریکا اقدام شد.

جدول ۳- نتایج آزمون nested-RT-PCR بر روی ۲۰درصد از نمونه‌های جمع آوری شده(بجای اسامی مزارع از اعداد استفاده شده است.). ×بدلیل این که در هنگام نمونه برداری در مزرعه بچه ماهی موجود نبود تنها نتیجه آزمایش صورت گرفته توسط سازمان دامپزشکی بر روی نمونه‌های اسپرم و تخم در مورد مزرعه مورد نظر آورده شده است.

ردیف	استان	nested-RT-PCR	درصد	nested-RT-PCR بعد از ۸ ماه
۱	چهارمحال و بختیاری	۲۷/(۳۰)	۹۰	
۲	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۳	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۴	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۵	چهارمحال و بختیاری	+×(سازمان)	-	
۶	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۷	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۸	چهارمحال و بختیاری	-	۰	
۹	مازندران	۱۲/(۱۲)	۱۰۰	
۱۰	مازندران	-	۰	
۱۱	مازندران	-	۰	
۱۲	مازندران	۲۴/(۳۰)	۸۰	
۱۳	مازندران	۱۳/(۱۳)	۱۰۰	۱۱/(۱۳)(۸۵درصد)
۱۴	مازندران	۲۲/(۲۴)	۹۲	
۱۵	مازندران	-	۰	
۱۶	کهگیلویه و بویراحمد	۱۹/(۲۲)	۸۶	۱۹/(۱۹)(۱۰۰درصد)
۱۷	کهگیلویه و بویراحمد	۵/۱۲	۴۲	
۱۸	کهگیلویه و بویراحمد	۶/(۸)	۷۵	
۱۹	کهگیلویه و بویراحمد	-	۰	
۲۰	کهگیلویه و بویراحمد	۱۴/(۱۴)	۱۰۰	
۲۱	کهگیلویه و بویراحمد	-	۰	
۲۲	فارس	۲۲/(۲۴)	۹۲	
۲۳	فارس	۱۳/(۱۳)	۱۰۰	۱۳/۱۳(۱۰۰درصد)
۲۴	فارس	۱۲/(۱۲)	۱۰۰	
۲۵	لرستان	-	۰	
۲۶	لرستان	۱۰/(۱۴)	۷۹	
۲۷	لرستان	-	۰	
تعداد کل نمونه		۱۹۹/(۴۲۶)	۴۷	

د- مرحله دوم)PCR (nested: پس از اتمام مرحله اول به منظور انجام nested-PCR با حجم ۳۰µl از مقادیر زیر شامل: ۳µl 10X PCR buffer، ۳µl $MgCl_2$ (25 mM)، ۳µl dNTPs(2 mM)، ۱/۵µl از پرایمر IHN2-F (20pmoles/µl)، ۱/۵µl از پرایمر IHN2-R (20 pmoles/µl)، ۰/۳-۱µl Taq DNA polymerase، ۲µl cDNA، ۱۵/۷-۱۵µl آب مقطر دوبار تقطیر استفاده و آنها را با یکدیگر مخلوط کرده و طبق برنامه شماره ۲ شامل مرحله آغازین(۹۴/۲min درجه سانتیگراد)، ۳۰ تکرار شامل مراحل واسرشتگی(۳۰sec/ ۹۴درجه سانتیگراد)، هم سرشتگی(۵۶/۳۰sec درجه سانتیگراد)، بسط(۷۲/۳۰sec درجه سانتیگراد)و در پایان مرحله بسط نهایی(۷۲/۵min درجه سانتیگراد)نسبت به انجام واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Endurance TC-412 TECHNE ساخت آمریکا اقدام شد

در پایان برای مشاهده محصول nested-PCR، از ژل آگارز (Science



تصویر۲- مقایسه RT-PCR و nested-RT-PCR از یک نمونه واحد مثبت اعلام شده: ستون ۱ باند مربوط به RT-PCR با سایز ۵۴۳bp. ستون ۲ مربوط به nested-RT-PCR با سایز ۴۸۴bp. مارکر مورد استفاده از نوع 1kb Plus DNA Ladder و بافر (رنگ)بارکننده از نوع 10X BlueJuice" Gel Loading Buffer هر دو ساخت Invitrogen-USA می‌باشد

Agarose LE-Roche Applied)۱/۵ درصد محتوی ۰/۵-۱µg/ml اتیدیوم بروماید استفاده شد. میزان ۱۲µl از محصول را بر روی ژل بارگیری نموده و به مدت ۲-۱/۵ ساعت تحت ولتاژ ۶۵ ولت توسط دستگاه مدل Rad 3000XI Bio، الکتروفورز می‌گردید. اندازه باندهای مورد انتظار حاصل از مراحل اول و دوم PCR به ترتیب ۵۴۳bp و ۴۸۴bp بود.

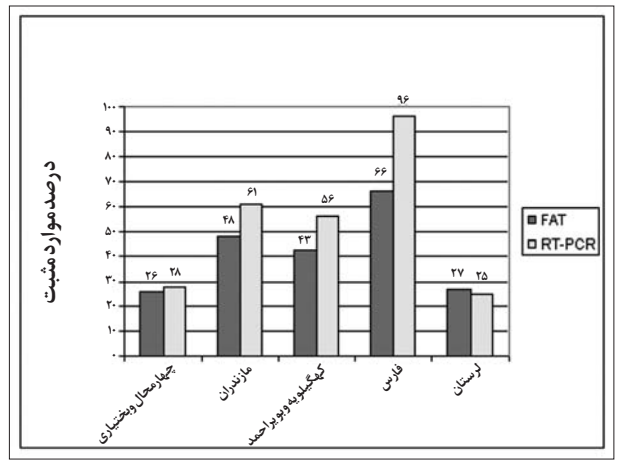
نتایج

نتایج حاصل از مطالعه در آزمایش IFA در جدول ۲ و بر اساس رویت نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت(تصویر ۱)آورده شده است. موارد مبتلا به تفکیک استان‌ها عبارتند از: چهارمحال و بختیاری ۱۲۳ مورد از ۷۰۰ نمونه، مازندران ۲۸۱ مورد از ۵۸۷ نمونه، کهگیلویه و بویراحمد ۱۷۱ مورد از ۳۹۸ نمونه، فارس ۱۶۱ مورد از ۲۴۵ نمونه و لرستان ۵۵ مورد از ۲۰۲ نمونه.

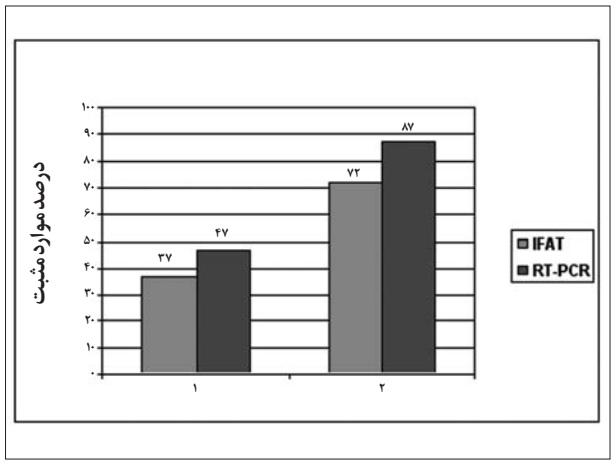
با توجه به این که امکان آزمایش nested-RT-PCR بر روی تمامی نمونه‌ها امکان پذیر نبود، لذا ۴۲۶ نمونه از ۲۱۳۲ نمونه اولیه جهت انجام آزمون PCR انتخاب گردید. بصورتی که نسبت موارد IFAT مثبت به موارد منفی نمونه‌های انتخاب شده از هر مزرعه ثابت در نظر گرفته شد تا بتوان نتایج این دو آزمون را با یکدیگر مقایسه نمود.

نتایج آزمون nested-RT-PCR نیز مطابق با رویت محصولات PCR به اندازه ۴۸۴bp(تصویر ۲)در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس این نتایج تعداد موارد مبتلا به تفکیک استان‌ها عبارتند از: چهارمحال و بختیاری ۲۷ مورد از ۳۰ نمونه، مازندران ۷۱ مورد از ۷۹ نمونه، کهگیلویه و بویر احمد ۴۴ مورد از ۵۶ نمونه، فارس ۴۷ مورد از ۴۹ نمونه و لرستان ۱۰ مورد از ۲۷ نمونه.

نتایج حاصل از IFAT و nested-RT-PCR پس از ۸ ماه: از طرف دیگر پس از ۸ ماه مجددا از نمونه‌های سه مزرعه(نگهداری شده در ۷۰-درجه



نمودار ۱- مقایسه روش‌های IFAT و nested-RT-PCR در تشخیص IHNV (در پنج استان منتخب).



نمودار ۲- مقایسه روش‌های IFAT و nested-RT-PCR نسبت به کل نمونه‌های مورد آزمایش(۱) و تنها در مزارع مبتلا(۲).

سانتیگراد)آزمون‌های IFAT و nested-RT-PCR به عمل آمد تا سودمندی این آزمایش‌ها در مورد نمونه‌های قدیمی از قبل تهیه شده نیز بررسی شود. نتایج حاصل در جداول ۲و۳ آورده شده است.

بحث

آزمون استاندارد غربالگری در مورد رابدو ویروس‌ها و بیرنا ویروس‌ها در آبزیان کشت سلولی بوده که متعاقبا توسط روش‌های سرمی مانند FAT و یا ملکولی مثل PCR مورد تائید قرار می‌گیرد(۱۱). روش کشت سلولی در عین وقت‌گیر بودن در مراحل حاد بیماری بسیار خوب عمل می‌کند، اما در مواردی که بیماری به صورت تحت حاد اتفاق می‌افتد از عمل کرد مناسبی برخوردار نیست. مؤلفین بسیاری استفاده از روش‌های PCR را به منظور تشخیص IHNV در محیط کشت سلولی و یا در بافت آلوده ماهی عنوان نموده‌اند(۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۲، ۹، ۳، ۲).

انجام کشت و جداسازی ویروس‌های آبزیان در ایران با مشکلات عدیده‌ای همراه بوده و فعلا انجام کشت سلولی ویروس‌های آبزیان به شکل بسیار محدود در مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور انجام می‌گیرد. بنابراین به‌کارگیری آزمون یا آزمون‌هایی مناسب که هم سرعت عمل بالا و هم حساسیت مورد قبولی را داشته باشد بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

آزمون IFA از سریعترین و قابل اطمینان ترین آزمون‌های ردیابی ویروس است(۱۸). مطابق نتایج حاصله در این تحقیق اگر انجام آزمایش بلافاصله و یا پس از مدت کوتاهی متعاقب برداشت نمونه انجام گیرد می‌تواند از کارایی بالایی به منظور تشخیص برخوردار باشد. هنگامی که سادگی و ارزانی آزمایش هم مد نظر باشد اهمیت آن بیشتر نمایان می‌شود.

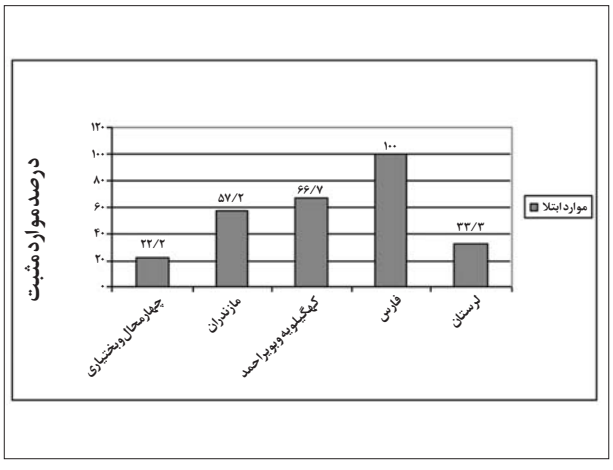
نتایج nested-RT-PCR در مقایسه با IFAT بیانگر حساسیت بیشتر و قابل توجه آزمایش nested-RT-PCR است(نمودار ۱). آزمایش‌های IFA و nested-RT-PCR به ترتیب ۳۷درصد و ۴۷درصد از کل نمونه‌های مورد آزمایش(۲۷ مزرعه)را مثبت نشان داده‌اند. اگر نتایج آزمون‌های فوق الذکر را تنها در مزارع آلوده(۱۴ مزرعه)در نظر بگیریم، میزان نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده توسط IFAT و PCR به ترتیب ۷۲درصد و ۸۷درصد است(نمودار ۲). مطابق نمودار ۳ استان فارس بیشترین و چهار محال و بختیاری کمترین آلودگی را نشان می‌دهند.

در مطالعه‌ای که توسط Barlic-maganja و همکاران در سال ۲۰۰۲(۳) انجام شده است حساسیت روش‌های ملکولی و کشت سلولی با یکدیگر همچنین بین روش RT-PCR تک لوله‌ای و دو لوله‌ای مقایسه شده است. در این مطالعه حساسیت روش ملکولی به‌ویژه هنگامی که عیار ویروس پایین است بیشتر از کشت سلولی بوده، ضمنا RT-PCR تک لوله‌ای واجد حساسیت بیشتر نسبت به RT-PCR دو لوله‌ای(مرحله‌ای)است.

در مطالعه حاضر نمونه‌های یک مزرعه(شماره ۲۷)، IHNV توسط روش مولکولی تشخیص داده نشد. در حالی که توسط IFAT مثبت اعلام شده بود. این مسئله می‌تواند بدلیل تخریب RNA در طی آماده سازی نمونه تا آنجام آزمایش باشد به عنوان مثال حضور سطح بالای فعالیت RNAse یا DNA پلی مراز متوقف کننده که در هنگام خالص سازی RNA بهمراه آن آمده است.

روش‌های مولکولی بدلیل حساسیت بالا و سرعت عمل به مراتب از روش کشت سلولی کاربردی تر به نظر می‌رسند. هنگامی که تعداد زیادتری تحت آزمایش قرار می‌گیرند و یا آلودگی توامان روش‌های ملکولی از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به کشت سلولی برخوردار می‌شوند. شایان ذکر است به منظور گرفتن یک پاسخ منفی در روش کشت سلولی نیازمند ۲۰-۱۴ روز زمان هستیم که همین مسئله برای برتری روش‌های مولکولی کفایت می‌کند.

در حال حاضر تنها عیب روش‌های مولکولی هزینه بالای انجام آنها است اما حساسیت و سرعت عمل آنها این عیب را می‌پوشاند. در صورتیکه PCR به عنوان یک آزمون متداول جهانی پذیرفته شود هزینه انجام آن در گروه‌های ۱۵-۱۰ تایی کاهش پیدا خواهد کرد. با تمام این تفاسیر بدلیل امکان بروز نتایج مثبت یا منفی کاذب در روش‌های ملکولی استفاده از کشت سلولی هنوز هم



نمودار ۳- مقایسه مزارع آلوده به IHNV در پنج استان.

تحت عنوان آزمون طلایی در تشخیص بیماری‌های ویروسی مورد قبول است.

در این بررسی به‌منظور بررسی تکرارپذیری آزمایش‌های IFA و PCR-nested-RT در تشخیص IHNV در نمونه‌های قدیمی (چند ماه گذشته)، پس از ۸ ماه (این مدت تنها بر اساس محدودیت زمانی انجام پروژه مذکور انتخاب گردید) مجددا بر روی نمونه‌های مثبت نگهداری شده در ۷۰- درجه سانتیگراد از سه مزرعه مبتلا آزمون‌های IFA و nested-RT-PCR انجام پذیرفت که نتایج قابل توجه به ترتیب ۱۶درصد و ۹۵درصد دریافت شد. این مسئله نشان می‌دهد که برای بررسی نمونه‌های قدیمی آزمون‌های ملکولی بسیار مناسبتر هستند. درصورتی‌که روش‌های سرولوژیک بشدت حساسیت شان را از دست می‌دهند. شاید این امر به واسطه حساسیت پروتئین‌ها نسبت به شرایط محیطی باشد که در طی زمان و تحت شرایط نامناسب تخریب و نهایتا آنتی‌ژن‌ها تغییر ماهیت می‌دهند (۸).

همانگونه که در قسمت روش‌ها و نتایج نیز ذکر گردید، به منظور افزایش ویژگی آزمون PCR اولیه اقدام به طراحی و استفاده از روش nested-PCR با استفاده از دو پرایمر داخلی اختصاصی برای ویروس گردید. بر اساس یافته‌های بسیاری از محققین به‌کارگیری روش nested-PCR موجب افزایش ضریب اطمینان و ویژگی PCR می‌گردد. به همین خاطر در تشخیص متداول ویروس IHN استفاده از تکنیک nested-PCR توسط محققین دیگر هم توصیه شده است (۱۶، ۱۳، ۲).

در پایان قابل ذکر است از آنجائی که احاطه بر وضعیت پراکنش یک بیماری مستلزم بازرسی‌های ممتد می‌باشد، لذا مطالعه حاضر نیازمند بررسی‌های تکمیلی دیگر همچون تکرار آزمایشات به صورت سالانه و ثبت نقشه حرکت لاروها بوده تا متعاقبا بتوان با اقدامات قرنطینه‌ای و ریشه کنی بیماری را تحت کنترل درآورد. از طرفی به نظر می‌رسد کار بر روی محیط‌های کشت سلولی مخصوص آبزیان و حفظ سویه‌های یافت شده در ایران جهت مطالعات بعدی همچنین جدا سازی و سکانسینگ سویه‌های یافت شده از اولویت‌های دیگر است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۸۰۰۲/۶/۴ و از محل اعتبارات ویژه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است. همچنین از کمک‌های آزمایشگاه تخصصی میکروب شناسی گروه بیماری‌های آبزیان و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دپارتمان پاتولوژی و میکروبیولوژی کالج دامپزشکی دانشگاه جزیره پرنس ادوارد کانادا و بخصوص دفتر بیماری‌های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور در جهت انجام طرح فوق کمال تشکر را دارد.

References

1. Akhlaghi, M. (1999) Immunological studies of suspected viral diseases, IHN and IPN in rainbow Hout. J. Vet. Res. 1:85-89.
2. Alonso, M., Rodriguez, S., Perez Prieto, S. I. (1999) Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfected with infectious pancreatic necrosis virus. J. Virol. Method. 81: 1-9.
3. Barlic-Maganja, D., Strancar, M., Hostink, P., Jencic, V., Grom, J. (2002) Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish Dis. 25: 73-80.
4. Bergman, S.M., Fichtner, D., Skall, H.F., Schlotfeldt, H., Olesen, N.J. (2003) Age- and weight -dependent susceptibility of raibow trout (Oncorhynchus mykiss) to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence. Dis. Aquat. Org. 55: 205-210.
5. Bruchhof, B., Morquardt, O., Enzmann, P. J. (1995) Differential diagnosis of fish rhab doviruses by reverse hanscriptuse- dependent polymerase chain reaction. J. Virol. Method. 55:111-119.
6. Fallahi, R., Soltani, M., Karegar, R., Zorrieh Zahra, M.E.J., Shchelkunov, I., Hemmatzadeh, F., Nouri, A. (2003) Isolation and identification of the IHNV-like agent from farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Iran. Archives of Razi. 56: 37-47.

7. Fallahi, R., Soltani, M., Zorrieh Zahra, M. E. J., Hemmatzadeh, F. (2006) Serological diagnosis of infectious haemato poietic necrosis disease (IHW) in rainbow Hout using indirect fluorescent antibody test. 61:15-19.
8. Hostink, P., Barlic-Maganja, D., Strancar, M., Jencic, V., Toplak, I., Grom, J.(2002) Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by RT-PCR methods. Dis. Aquat. Org. 52: 179-184.
9. Lapatra, S. E. (1990) Size-related susceptibility of salmonids to two strain of infectious hematopoietic necrosis virus. Transactions of American Fisheries Society. 119: 25-30.
10. Morzunov, S. P., Winton, J. R., Nichol, S. T. (1995) The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. Virus Res. 38: 175-192
11. OIE, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2003), Paris, France.
12. Ristow, S.S., Lorenzen, N., Jørgensen, P. E. V. (1991) Monoclonal-antibody-based immunodot assay distinguishes between viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). J. Aquat. Anim. Health. 3: 176-180.
13. Roberti, K. A., Rohovec, J. S., Winton, J. R. (1998) Vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis(IHN)by using attenuated mutants selected by neutralizing monoclonal antibodies. J. Aquat. Anim. Health. 10: 328-337.
14. Smail, D. S., Munro, A. L. S. (2001) The virology of teleosts. In: Fish Pathology, third edition, Roberts, R.J., W.B. SUNDERS.,UK, p. 169-253.
15. Wang, W-S., Lee, J-S., Shieh, M-T., Wi, Y-L., Huang, C-J. and Chien, M-S. (1996) Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout Oncorhynchus mykiss from an outbreak in Taiwan by serological and polymerase chain reaction assays. Dis. Aquat. Org. 26: 237-239.
16. Williams, K., Blake, S., Sweeny, A., Singer, J. T., Nicholson, B. L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses, J. Clin. Microbiol. 41:39-41.
17. Winton, J.R. (1991) Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. Ann. Rev. Fish Dis. 1:83-93
18. Winton, J. R., Einer-Jensen, K. (2002) Molecular Diagnosis of Infectious Hematopoietic Necrosis and Viral Hemorrhagic Septicemia. In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases (Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries), Cunningham, Co., Aberdeen,UK.
19. Wolf, K.(1988) Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Fish Viruses and Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY, p. 83-114.
20. Yamamoto, T., Batts, W. N., Arakawa, C. K., Winton, J. R. (1990) Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: Whole body assay and immunohistochemistry. J. Aquat. Anim. Health. 2: 271-280.

J.Vet.Res. 63,3:99-105,2008

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

Zargar,A.[1], Soltani,M.[1]*, Hematzadeh,F.[2], Kazemi,B.[3], Ebrahimzadeh Mousavi,H.A.[1]

[1]*Department of Aquatic Animal Health,Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Microbiology,Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Biotechnology Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran-Iran*

(Received 9 March 2005 , Accepted 18 November 2006)

Abstract:

Distribution of infectious hematopoietic necrosis(IHN) was studied in five major provinces producing rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)fry in Iran by indirect fluorescence antibody IFAT and nested-RT-PCR techniques. Also the effect of time duration was examined on some positive samples after 8 months post sampling. Samples of kidney, liver and spleen of rainbow trout fries collected from 27 trout farms were processed and examinated. Fourteen trout hatcheris located in all provinces were identified to be contaminated with IHNV tested by both techniques. The obtained results also showed that nested-RT-PCR is more sensitive than IFAT test particularly if samples are stored for a longer time.

Key words: Infectious Hematopoietic Necrosis, rainbow trout, IHNV, IFAT, nested-RT-PC.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021- 61117162, Fax: 021-66933222**