بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی
Viral Heamorhagic Septicemia)VHS

نویسنده : دکتر امراله قاجاری
مدیرکل دفتر بهداشت و مدیریت بیماری های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور

عامل بیماری

درگذشته، گروهی از دامپزشکان اروپایی اعتقاد داشتند کمبودهای تغذیه ای(کمبود ویتامینها مانند ویتامین E و B12) عامل بیمارند، اما، بعدها متوجه شدند که عامل بیماری، میکروبی و نوعی ویروس متعلق به خانواده رابدوویریده، و جنس نووی رابدوویروس۱ می باشد و کمبود های تغذیه ای، تنها می تواند به عنوان یکی از عوامل مستعد کننده در ظهور و افزایش تلفات این بیماری ایفای نقش نماید(مخیر, ۱۳۸۹)

طبقه بندی رایج

ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی عضوی از جنس نوی رابدوویروس از خانواده رابدوویریده می باشد. نوعی از ویروس در این جنس ویروس وابسته به ماهی به نام نکروز عفونی بافت خونساز می باشد. اعضای این جنس یک شکل عمومی و مشخص در درون خانواده رابدوویریده دارند(حضور یک ژن کد کننده پروتئین های غیر ویریونی). در این خانواده، همچنین ویروسهای بیماریهای تورم دهان طاولی۲، هاری، تب سه روزه گاو، نکروز عفونی بافتهای خونساز ماهی و هیرام رابدوویروس در سفره ماهی ژاپنی(پارالیکتیس اولیواسئوس ۳) قرار دارند. ویروس از نظر شکل به ویروس تورم دهان طاولی و از نظرترکیب پلی پپتید ، به ویروس هاری شباهت دارد(Olesen and Skall, 2011a)

مورفولوژی و ساختار ویریون

رابدوویروس ها ویروس های فشنگی شکلی هستند که به طور معمولی تقریباً حدود ۷۵×۲۰۰ نانومتر اندازه دارند. ویروس VHS دارای تقارن مارپیچی بوده و اندازه ذره ویروسی از ۷۵×۱۶۵ نانومتر تا ۷۵×۲۴۰ نانومتر متغیر است. ذره ویروسی حاوی یک هسته مرکزی مارپیچی از RNA تک رشته ای سنس منفی است که بوسیله ماتریکس پروتئینی احاطه می شود. این ماتریکس پروتئینی پروتئین های اصلی ساختمانی هستند. نوکلئوکپسید بوسیله یک لایه لیپوپروتئینی خارجی احاطه می شود. حدس زده می شود که شبیه سایر مدل های رابدوویروس نظیر ویروس هاری از جنس لیزاویروس۴ می باشد(Olesen and Skall, 2011a).

[1] Novirhobdovirus
[2]Vesicular stomatitis
[3] Paralichthys olivaceus
4 Lyssavirus

کپسید مارپیچ این ویروسها به وسیله غلافی احاطه شده، روی آن را پوشش خارجی واجد پپلومرهای با طول ۵ تا ۱۵ نانومتر پوشانیده است. پوشش خارجی از جنس گلیکوپروتئین بوده که باعث تولید آنتی بادی های خنثی کننده[5] است. ژنوم، شش پروتئین را سنتز می کند شامل یک نوکلئوپروتئین(N)، یک گلیکوپروتئین(G)، یک فسفوپروتئین(P که معمولاً M1 را تشکیل می دهد)، یک پروتئین ماتریکس(M که معمولاً M2 را تشکیل می دهد)، یک پروتئین غیر ویریونی(NV) و یک پلی مراز(L) می باشد.ویریون VHSV شامل پنج پروتئین است که عبارتند از : نوکلئوپروتئین فسفوریله، پروتئین وابسته به پلی مراز، پروتئین ماتریکس، گلیکوپروتئین و RNA پلی مراز (OIE 2016).

پروتئین های ساختمانی به نحوی آرایش یافته اند که رشته ریبونوکلئوکپسید را می پوشانند و این ساختار بوسیله یک غشای دو لایه پروتئینی احاطه می شود و از این غشاء گلیکوپروتئین ها به صورت زائده بیرون زده می شوند. گلیکوپروتئین های VHS باعث شکل گیری هموترایمر می شوند. اینها مهمترین آنتی ژن های اصلی سطحی خنثی کننده می باشند که مسئول اتصال و ورود به داخل سلول های میزبان بوده و نشان داده شده است که مهمترین مولکول های ایجاد کننده ایمنی میزبان می باشند. هسته نوکلئوکپسید باعث ایجاد فعالیت ترانس کریپتاز ویروس شده و حاوی ریبونوکلئوپروتئین ژنوم تک رشته ای تولید کننده پروتئین ها می باشد. پروتئین ماتریکسM پوشش ویروس را شکل می دهد و با قسمت سیتوپلاسمیک گلیکوپروتئین ارتباط و متصل می شود.

در واقع پروتئین M هم به قسمت داخلی پروتئین G غشاء از یک سمت و از سویی دیگر به ریبونوکلئوپروتئین از طریق واکنش های متقاطع ارتباط دارد(Olesen and Skall, 2011a).

۳-۱-۱-۲ سیکل تکثیر ویروس

سیکل تکثیر ویروس به طور اساسی شامل ۵ مرحله اصلی است:

جذب:

گلیکوپروتئین مسئول اتصال ویروس به گیرنده های غشای سلولی می باشد . یک گیرنده اختصاصی در سلولهای تک لایه ای اخذ شده از سالمونیده که می تواند بوسیله مونو کلونال آنتی بادی (M45) بلوک گردد ، شناسائی شده است . این مونو کلونال آنتی بادی به منظور پیشگیری از عفونت به ویروس ماهی استفاده می شود.

نفوذ و پوشش برداری :

نفوذ به داخل سلولهای میزبان و پوشش برداری از غشاء ویریون بلافاصله پس از جذب صورت می گیرد و این دو اتفاق به آسانی از هم قابل تفکیک نیستند.

گرانزو۶ و همکاران (۱۹۹۷) نشان داده است که ورود رابدوویروس ماهی و ویروس بهاره کپور ماهیان به غشای پلاسمایی از طریق آندوسیتوز با واسطه پذیرنده رخ می دهد. متعاقب آندوسیتوز وزیکول پوشش دار با لیزوزیم اولیه چسبیده و نتیجه آن آزاد شدن نوکلئوکپسید است به طوری که تجمع آن باعث شکل گیری انکلوژن بادی سیتوپلاسمی می شود که نشانگر علائم اولیه عفونت VHS است(Granzow et al., 1997).

[5] Neutralizing antibody
[6] Granzow

ترجمه و نسخه برداری :

نسخه برداری اولین رخداد متابولیکی متعاقب آزاد شدن نوکلئوپروتئین بدون پوشش به داخل سیتوپلاسم است. ژنوم با قطبیت منفی متعاقباً نسخه برداری میشود.

کپی برداری :

کپی برداری باعث تولید ژنوم RNA منفی مکمل می گردد. پلی مراز باعث سنتز RNA و کامل شدن طول رشته میگردد.

بازآرائی و جوانه زدن[7] :

تکثیر ژنوم ویروس و ترجمه آن بلافاصله صورت گرفته و پروتئین های سنتز شده به ژنوم RNA ویروس متصل شده و رشته نوکلئوپروتئین را ایجاد می کنند. در خلال این اتفاقات ، پروتئین G به صورت مستقل بر روی پلی ریبوزوم های متصل به غشاء تولید و گلیکوزیله شده و در ساختارهای وزیکول ، پوشش دار شده سپس به غشای پلاسمایی مهاجرت می نماید. نوکلئوکپسید به شدت پیچ خورده سپس بوسیله غشاء سیتوپلاسمی پوشیده شده از گلیکوپروتئین پوشش دار گردیده و به سمت جوانه زدن و آزاد کردن ویریون عفونی هدایت می شود (Sung-Hyun, 2017)

حساسیت ویروس

غشاء ویروس، به بسیاری از ضدعفونی کننده ها حساس است[8]؛ این ویروس، در برابر حلال های چربی نظیر اتر خیلی حساس بوده، در درجه حرارت محیط زندگی و در گلیسیرین ۵۰ درصد و کلروشکل بی اثر گردیده، بشدت به محیط اسیدی و حرارت نیز حساس می باشد؛ در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، در عرض ۱۵ دقیقه از بین می رود. الکل و پراکسید هیدروژن بر روی ویروس چندان مؤثر نمی باشند. در حالت خشک، حداقل به مدت یک هفته زنده می ماند، اما، در آب شیرین، در دمای ۴ درجه سانتیگراد حدود ۲۸ تا ۳۵ روز، در دمای صفر درجه سانتیگراد حدود ۳ ماه، ولی در ۲۰- درجه سانتیگراد یا کمتر و یا از طریق لیوفیلیزاسیون، به مدت طولانی(تا چند سال) زنده می ماند. ویروس، در آب شیرین فیلترشده، در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا ۱ سال عفونی زا خواهد ماند. همچنین، در ph ۵ تا ۱۰ طی چندین مرحله انجماد و یخ زدائی ، مقاوم می باشد. بیشترین فعالیت ویروس در دمای ۱۴- ۱۲ درجه سانتیگراد می باشد. در آب شیرین بدون مواد آلی و دمای ۱۵ درجه سانتیگراد، حدود ۹۹/۹ درصد ویروس پس از ۱۳ روز و در آب شور پس از ۴ روز غیر فعال می گردد؛ در آب شور با دمای ۱۵ درجه سانتیگراد، عفونت زایی ویروس پس از ۱۰ ساعت تا ۵۰ درصد کاهش می یابد ولی تا ۴۰ ساعت بعد هم امکان جداسازی و بیماریزایی ویروس وجود دارد. با منجمد سازی ماهی آلوده با VHS به صورت تجاری، بیماریزایی یا تیتر ویروس تا ۹۰ درصد یا بیشتر کاهش می یابد ولی ویروس به صورت کامل کشته و حذف نمی گردد(Olesen and Skall, 2011a)(، OIE 2016)

---

[7] Assembly And Budding

[8] برای ضدعفونی استخرها و کانالهای سیمانی می توان از ترکیبات چهارتایی آمونیوم، هیدروکسید سدیم، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم، محلول شکلالین، کلرین، کلرامین تی، ویرکن اس و یا یدوفورها استفاده نمود. شکلالین ۳ درصد در عرض ۵ دقیقه و هیدروکسید سدیم ۲ درصد و اشعه UV در عرض ۱۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد ویروس را غیر فعال می کنند. همچنین، کلرین در عرض ۲۰ دقیقه، ۹۹ درصد ویروس را غیر فعال می نماید. phاسیدی(در حد ۳) در عرض ۳ ساعت باعث کاهش عفونی زایی شده، NaOH(ph۱۲)، ویروس را در عرض ۵ تا ۱۰ دقیقه غیر فعال می نماید. ترکیب شکلالین و سولفات مس می تواند مؤثر باشد؛ سولفات مس به مقدار ۲۰۰ گرم و شکلالین ۴۰ درصد تجاری به مقدار ۲ لیتر با ۵ لیتر آب بخوبی حل گردیده، در سطح استخر ۲/۵ در ۲۵ متر با ورودی آب ۱۰ لیتر بر ثانیه پاشیده می شود. همچنین، می توان از شکلالین به مقدار ۱ میلی لیتر در هر ۴ لیتر آب به مدت ۱ ساعت یا آهک زنده به مقدار ۱ گرم در هر ۲ لیتر آب برای ضدعفونی ماهیان مولد با ارزش، برای پیشگیری از بیماری استفاده نمود. حمام نمک به همراه بهبود کیفی آب یک توصیه عمومی است.

خصوصیات آنتی ژنیک و فیلوژنیک :

- شکل ویروس

به طور معمول همراه با بسیاری از ویروس های RNA دار دارای ژنوم با قطبیت منفی به سادگی ذرات دفاعی مداخله کننده [9] (ویروس هائی حاوی RNA کوتاهتر و مقدار کمتر RNA)تولید می کنند. چنین ذراتی با ویروس عفونی کامل برای اتصال به سطح سلول ها مداخله نموده و باعث رقابت برای باند شدن به سایت های گیرنده سلولی و نتیجتاً بلوک تکثیر ویروس با طول کامل استاندارد می گردند(Olesen and Skall, 2011a).

- سروتیپ و سویه

سه سروتیپ از ویروس VHSV شرح داده شده است. تیپ۱ تحت عنوان سویه F1 (دانمارک) توصیف شده است. تیپ ۲ تحت عنوان سروتیپ هدودام از دانمارک جدا شده است . تیپ ۳ تحت عنوان سویه فرانسوی۲۳/۲۷ از قزل آلای قهوه ای جدا سازی شده است. این سه سروتیپ بوسیله ی آزمایش خنثی سازی سرمی از هم تفکیک می شوند. اولسن و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که هم پوشانی قابل ملاحظه ای درون و بین این سروتیپ ها وجود دارد. این نویسندگان سروگروپ های[10] واقعی تر را با استفاده از واکنش متقاطع آنتی سرم پلی کلونال و چهار آنتی بادی مونوکلونال تعریف نمودند و پیشنهاد کردند که سه سروتیپ تحت عنوان سه سروگروپ تشخیص داده شوند(Olesen et al., 1993).

سروگروپ۱ ، که توسط همه چهار مونوکلونال آنتی بادی ضد F1 خنثی می شود سروگروپ ۲ فقط بوسیله یک مونو کلونال آنتی بادی ضد F1 خنثی می شود و سروگروپ ۳ بوسیله هیچ یک از مونو کلونال آنتی بادی خنثی نمی شود اما به صورت جزئی بوسیله آنتی بادی ضد F1 خنثی می شود و گاهی هم خنثی نمی شود.

اگر چه سه تا سروگروپ تعریف شده است لیکنOlesen و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که ۱۲۰ جدایه[11] از ۱۲۷ جدایه ویروس بوسیله آنتی سرم ضد F1 خنثی می شوند بنابراین این یافته نشان داد که عناصر آنتی ژنتیکی مشترکی بین جدایه ها وجود دارد (Olesen et al., 1993).

سروگروپ ها در واقع ساب تایپ۱۲ های درون سروتیپ ها بودند و نوع ساب تایپ به نوع مونو کلونال آنتی بادی مورد استفاده بستگی دارد. آن چه که از مطالعه VHS بوسیله اولسن و همکاران (۱۹۹۳) استنباط شد این بود که یک تغییرآنتی ژنتیکی از دوره های ۱۹۸۱-۱۹۶۵ تا ۱۹۹۲ در دانمارک رخ داده است به نحوی که جدایه های متعلق به سروتیپ ۱ در سال ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۲ بطور گسترده ای بوسیله سروتیپ ۲ جایگزین شده است.

---

[9] Defective interfering particles
[10] Serogroups
[11] Isolate
[12] Subtype

آن چیزی که از سویه های ویروس VHSV دریایی در آب های اروپا از ماهی کاد۱۳و هادوک ۱۴ در دریای شمال و ماهی توربوت ۱۵ در جزایر گیقا۱۶ اسکاتلند دانسته شد این است که سه سروگروپ خنثی کننده وجود دارد(Olesen et al., 1993).

- **ژنوتیپ** [۱۷]

بر اساس آنالیز فیلوژنی رشته های نوکلئوتیدی چهار ژنوتیپ از VHSV مشخص شده است. در تعیین پراکندگی این ژنوتیپ ها توزیع جغرافیایی مهم تر از اختصاصیت میزبانی می باشد.

- **توزیع جغرافیایی و دامنه میزبانی ژنوتیپ های جدا شده**

ژنوتیپ ۱ (G1) شامل چندین تحت تیپ به شرح ذیل میباشد:

ژنوتیپ G1a: شامل جدایه هایVHSV در چرخش در مزارع قزل آلای رنگین کمان در سراسر اروپا می باشد. به طوری که به طور معمول همراه با بروز علائم بیماری و خسارات اقتصادی فراوان می باشد توزیع ژنوتیپ Ia بدون شک به طور قوی بوسیله فاکتورهای آنتروپوژنیک ۱۸ توام با فعالیت های پرورش ماهی تحت تأثیر قرار گرفته است. ازآنجائیکه ویروس عامل اولین رخداد بیماری VHSV در قزل آلای پرورشی انگلیس در سال۲۰۰۶ درگروه GIa طبقه بندی شد به طور قوی احتمال ورود ویروس از یک منطقه آلوده درون اروپا را نشان داد(Stone et al., 2008) .همچنین این ژنوتیپ بطور عجیبی شامل جدایه هائی می باشد که به صورت گسترده از ماهی های بدون علائم صید شده در دریای بالتیک می باشد. این یافته بصورت قوی این فرضیه را تأیید می کند که ویروس VHS وارد شده به مزارع پرورش قزل الا از دریای بالتیک منشأ گرفته است و احتمالاً از طریق یک اقدام متداول نظیر استفاده از فراورده های ماهی وحشی غیر پاستوریزه به عنوان خوراک در صنعت آبزی پروری وارد شده است(Olesen and Skall, 2011b).

ژنوتیپ Ib شامل جدایه های دریایی جدا شده از دریای بالتیک ، مناطق اسکاگرل ۱۹ ، کاتی گات۲۰ ،دریای شمال و کانال انگلیس می باشد. در یک آزمایش فیلدی تجربی ژنوتیپ یک b (GI-b)جدا شده از ماهیان دریایی وحشی به طور معمولی باعث ایجاد بیماری به شکل کلینیکی در قزل آلاهای پرورشی نگردید. این یافته نشان داد که دربعضی از موارد در هنگام تغییر محیط ژنوتیپ های دارای حدت به طرف تطابق یا تغییر ، گرایش یافته اند. این نوع از تغییر در حدت به نظر می رسد در زمان های متفاوت و به صورت چند باره به همراه رخداد بیماری VHS در ماهی قزل آلای پرورشی در تحت گروه ژنوتیپ I اتفاق افتاده است.

---

[13] Gadus morhua
[14] Melanogrammus aeglefinus
[15] Psetta Maxima
[16] Gigha
[17] Genotype
[18] Anthropogenic
[19] Skaggerale
[20] Kattegut

به نوع عجیبی ژنوتیپ یک b (GI-b)در خارج از دریای بالتیک در ماهی هرینگ۲۱ صید شده در کانال انگلیس و شرق جزایر شتلند۲۲ یافت شد. این یافته می تواند انعکاسی از مهاجرت میزبانی و ساختار جمعیتی گونه میزبان باشد.

ژنوتیپ Ic شامل یک گروه کوچک از جدایه های قدیمی دانمارک از قزل آلای رنگین کمان آب شیرین می باشد. ژنوتیپ Id شامل یک گروه کوچک از جدایه های جدا شده از ماهی قزل آلا در آب شیرین از خلیج فنلاند می باشد. ژنوتیپ Ieشامل جدایه های جدا شده از توربوت های زنده سواحل ترکیه در دریای سیاه می باشند (Nishizawa et al., 2006)

جدایه ژنوتیپII فقط از ماهیان حیات وحش در نواحی محدودی از دریای بالتیک ، حوزه آبریز گاتلند۲۳ گزارش گردید. آنالیز جدایه های ژنتیکی نشان داد که ژنوتیپ اصلی خیلی سال قبل جدا شده است. این موضوع نظریه منشأ دریایی ویروس VHS را تقویت می کند.

ژنوتیپIII شامل جدایه های ماهیان صید شده در دریای شمال و شرق و غرب اقیانوس اطلس می باشد. ویروس های مسئول رخدادهای بیماری در توربوت های پرورشی هم در این ژنوتیپ جای می گیرند. توربوت ها به صورت تجربی به تعداد زیادی از جدایه های ژنوتیپ III حساسیت دارند.

ژنوتیپIV اولین بار در شمال غرب اقیانوس آرام کشف شد اما متعاقباً در شرق ایالات متحده آمریکا در نواحی دریاچه های بزرگ ۲۴ و ژاپن تشخیص داده شد. این حقیقت که ویروس VHS در ماهیان قزل آلای پرورشی در ایالات متحده آمریکا گزارش نشده است به همراه موضوع جدا سازی ژنوتیپIV در نهایت تئوری منشأ دریایی ویروس VHS را تقویت کرد. ویروسی که اخیراً در نواحی دریاچه های بزرگ گسترش یافته است در یک تحت گروه جداگانه به اسم ژنوتیپ IVb طبقه بندی گردید. ورود احتمالی این ویروس به محیط بالقوه جدید باعث ایجاد یک همه گیری گسترده در گروه زیادی از ماهی ها که احتمالاً قبلاً گونه های ماهی وحشی بومی بوده اند ، گردید(Olesen, 2015).

ژنوتیپهای نوع Ib، II و III ، بیشتر، ماهیان دریایی را مبتلا می نمایند. حساسیت ماهی قزل آلای رنگین کمان به ژنوتیپ I اروپایی زیاد و به ژنوتیپ IV کم می باشد. برخلاف بیماری نکروز عفونی بافتهای خونساز(IHN) تا مدتها، به نظر می رسید سویه های بیماریزا در آب شیرین، در آب شور بیماریزا نباشند و برعکس، اما، همه گیریهای با ژنوتیپ III(ژنوتیپ دریایی) ویروس در ماهیان پرورشی کشور نروژ نشان داد که سویه های دریایی ویروس قادر به سرایت به ماهیان قزل آلای پرورشی نیز هستند(Olesen and Skall, 2011a).

انتقال

ویروس VHS یک ویروس به شدت قابل انتقال بوده و در عفونت های تجربی می تواند از طریق تزریق داخل پری تونیوم ، حمام دادن و همزیستی ۲۵ منتقل شود. به عنوان مثال لوپزواسکازز ۲۶ و همکاران(2007) حدت ویروس جدایه ماهی هالبوت

[21] Herring
[22] Shetland
[23] Gotland
[24] Great lakes
[25] Cohabitation
[26] Lopez-vasquez

گرینلند۲۷ وحشی را در ماهی توربوت آزمایش کردند(Lopez-Vazquez et al., 2007). به طور اساسی ویروس VHS برای بچه ماهیان در سنین مختلف (دارای کیسه زرده۲۸ ، فرای ۲۹ ، انگشت قد) نسبت به ماهیان مسن تر به شدت پاتوژنیک می باشد. ویروس به صورت تجربی از ادرار ماهیان قزل آلای بیمار جدا شده است که نشان دهنده انتقال افقی ویروس به این روش می باشد.

انتقال بیماری عمدتا به صورت افقی و از طریق تماس مستقیم با آب آلوده به ویروس صورت می گیرد آب از طریق ترشحات دفعی و ترشحات پوستی ماهیان مبتلا آلوده می شود. انتقال عمودی بیماری، واقعی نیست. ورود عامل بیماری به بدن از طریق آبششها و زخمهای پوستی صورت می گیرد. عفونت تجربی از طریق تزریق مایع حاوی ویروس کشت سلولی، مالیدن سوسپانسیونهای بافتی ماهیان آلوده به سطح آبششهای ماهیان سالم و تزریق مایع صاف شده از ارگانهای آلوده هموژن موفقیت آمیز بوده است، اما، معمولاً، مدرکی در رابطه با انتقال ویروس از طریق خوراکی و دهان وجود ندارد و به نظر می رسد PH اسیدی معده، آن را نابود می کند.

ماهیان مولد مبتلا، مقادیر زیادی ویروس را از طریق مایعات تخمدانی دفع می کنند، اما تخمها پس از چند روز مجاورت با آب روان، از ویروس پاک می شوند. ماهیان، در تمام سنین قادر به دفع ویروس هستند. علاوه بر ماهیان بیمار، ماهیان سالم نیز قادر به حمل و انتقال ویروس هستند. انتقال، بآسانی و بسرعت در دمای ۱ تا ۱۵ درجه سانتیگراد اتفاق می افتد، اما در دمای بالای ۲۰ درجه سانتیگراد نیز می تواند صورت گیرد(Olesen and Skall, 2011a).

این بیماری، یک بیماری واگیردار مشخص است که ظهور و شیوع آن در یک موسسه پرورش ماهی معمولاً، در پی وارد کردن ماهیان قزل آلای زنده از یک موسسه آلوده دیگر دیده می‌شود(مخیر ، ۱۳۸۹). ماهیان وحشی به عنوان یک فاکتور مهم برای انتقال بیماری مطرح هستند. ماهیان قزل آلای آلوده که به رودخانه راه پیدا کرده اند، می توانند باعث انتشار بیماری گردند. اعتقاد بر این است که استفاده از ماهیان دریایی آلوده به بیماری در جیره های غذایی تر و تازه و تخم چشم زده آلوده، سبب انتقال بیماری می گردد. ویروس عامل، در تمام سنین می تواند به ماهی حساس منتقل شود. این ویروس می تواند در بدن ماهی میزبان حامل، برای مدت طولانی باقی بماند و از طریق ادرار و ترشحات جنسی ماهی دفع شود. انتقال بیماری از طریق سطوح تخمهای آلوده ممکن است صورت بگیرد، اما انتقال عمودی و ورود ویروس به داخل تخم به اثبات نرسیده است. به طور تجربی می توان ماهیان را با تزریق عضلانی، داخل صفاقی و غوطه وری در آب حاوی ویروس، آلوده کرد. با وجود این که تاکنون میزبان واسطی برای ویروس این بیماری تأیید نشده است، اما، اخیراً، نشان داده شده که زالوها می توانند نقش بسیار مهمی در انتقال آن داشته باشند، به طوری که عامل بیماری از بیش از ۵۰ درصد از زالو های جمع آوری شده از مناطق اندمیک جدا شده است. همچنین، ویروس عامل از سخت پوستان دیپوره [۳۰] نیز جدا شده است. تاکنون هیچگونه ماهی ناقل مکانیکی برای ویروس شناسایی نشده، اما، همان گونه که قبلاً ذکر گردید طیف وسیعی از گونه های ماهیان به بیماری حساس هستند. عقیده بر این است که برخی پرندگان مانند حواصیل می توانند ویروس را به طور مکانیکی انتقال دهند. منشأ بیماری، ویروس موجود در محیطهای دریایی بوده،

[27] Greenland halibut
[28] Sac fry
[29] Fry
[30] Diporea

ماهیان مبتلا به شکل مزمن یا نهفته بیماری و ماهیان وحشی، منبع اصلی آلودگی و ضامن بقای ویروس محسوب می شوند(OIE ,2016).

بیماریزایی

ویروس VHS از طریق اتصال به اپی تلیوم آبشش وارد بدن ماهی شده و سپس از طریق خون وارد ارگان های اصلی داخلی می شود. همچنین شواهدی وجود دارد که پوست می تواند راه ورود ویروس باشد. کولیت[۳۱] و همکاران (2007) نشان دادند که با استفاده از روش ارزیابی تکثیر ویروس در بافت باله جداشده (VREFT)[۳۲] ، میزان تکثیر ویروس در بافت باله قزل آلاهای مواجه شده با ویروسVHSV از طریق آب با سطح مرگ و میر در ماهیان قزل آلای مواجه شده با VHSV از همان گونه ارتباط مثبت داشت(Quillet et al., 2007) . بنابراین ارزیابی VREFTیک اندیکاتور خوب در تعیین حساسیت میزبانی است. احتمالا سلول های پوستی آلوده شده به VHSV یک مسیر ورودی برای ویروس می باشند ولی شواهدی که این موضوع را تأیید یا رد کند در دسترس نمی باشد. تحقیقات نشان داده است که سلول های آبشش به صورت اختصاصی در جذب و ورود نه تنها ویروس VHS بلکه ویروس IHN مهم هستند.

ویروس اولین اثرات پاتولوژیک خود را بر روی سلول های پوشاننده سیستم گردش خون ۴۸ ساعت پس از عفونت از طریق اتصال ، نفوذ و تکثیر در سلول های آندوتلیال سیاهرگ های کوچک و سینوزئیدها ایجاد می کند.سپس ویروس به قسمت قدامی کلیه گسترش یافته و باعث دژنراسیون سلولی و نکروز سلول های بافت خون ساز کلیه و ماکروفاژها و ملانوماکروفاژها ۴-۲ روز بعد از عفونت می شود. سپس عفونت به کبد گسترش می یابد و نهایتاً نکروز سلول های آسینار پانکراس رخ می دهد(۶روز). اونسن[۳۳] و همکاران (۱۹۹۴) توزیع ویروس با استفاده از آنتی ژن های ویروس را با استفاده از رنگ آمیزی IHC برای سویه F1 عفونت قزل آلای رنگین کمان نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند که ۲ روز پس از عفونت ویروس ، می توان ویروس را با استفاده از تکنیک های جدا سازی ویروس نشان داد(EVENSEN et al., 1994). در حالی که بوسیلهIHC قابل تشخیص نیست و این نشان دهنده حساسیت روش جدا سازی ویروس نسبت به رنگ آمیزی مبتنی بر آنتی بادی می باشد(Olesen and Skall, 2011a).

دفــع ویروس

دفع ویروس از راه ادرار در مولدین حامل ۳ روز پس از ایجاد آلودگی تجربی از طریق حمام دادن ماهیان قزل آلای رنگین کمان رخ می دهد (نیوکیرچ[۳۴]1984). ولی شواهدی از دفع ویروس از طریق مدفوع به دلیل حساسیت ویروس به اسید معده دیده نشده است. در مورد ماهیان دریایی نظیر کاد[۳۵] و هادوک [۳۶] احتمال دارد پوست نیز یک منبع دفع ویروس باشد. در گونه های دریایی نظیر توربوت[۳۷] یک الگوی مشابهی از پاتوژنز به همراه خونریزی بالای کره چشم و لبه های باله ها و تورم قابل ملاحظه

---

[31] Quillet
2 Viral replication in excised fin tissues
[33] Evensen
[34] Neukirch
[35] Cod
[36] Haddock
[37] Turbot

ناشی از بهم خوردن تعادل اسمزی مشاهده می شود.در این ماهیان نیز سلسله وقایع ورود ویروس از طریق آبشش به سیستم گردش و سپس به طرف ارگان های هدف ، کلیه قدامی و کبد تکرار می شود. نکروز سلول های هدف هماتوپوئیتیک به سرعت باعث از کار افتادن کلیه و مرگ و میر می شود(Olesen and Skall, 2011a)

مکانیزم بیماری/ پاتوفیزیولوژی

کلیه ها ، قلب و کبد ارگان های هدف برای ویروس هستند. نکروز کامل سلولی و بافتی در این بافت ها دیده شده است. به طوری که در مورد کلیه ها ، بسرعت باعث از دست رفتن وظیفه دفعی و تنظیم اسمزی بدن می شود. به طوری که به طور طبیعی باعث ایجاد ادم و ظاهری نفخی می شود. نکروز کبدی باعث از دست رفتن ذخیره گلیکوژنی و ذخایر انرژی شده و نارسایی قلبی ایجاد شده در آسیب سلول های میوکارد نقش دارد.

مشخصه اصلی عفونت VHS در ماهیان قزل آلا خونریزی است. به عنوان مثال اطراف کره چشم ، درون بافت چربی محوطه شکمی یا روی عضلات بدن . این علائم ظاهری خارجی و داخلی منعکس کننده حساسیت شبکه فوق العاده نازک مویرگی ونول ها و آندوتلیال سل ها سیستم گردش خون نسبت به ویروس می باشد. به نحوی که جوانه زدن VHSV از این سلول ها باعث به هم خوردن هموستاز طبیعی گردش خون و آزاد شدن اریتروسیت ها به داخل بافت ها می شود. این به وضوح در عضلات و اطراف کره چشم دیده می شود(Olesen and Skall, 2011a)

مشخصات فاکتورهای حدت

فاکتورهای اختصاصی حدت برای VHSV به خوبی مطالعه نشده است. ولی به نظر می رسد چند عاملی بوده و تحقیقاً اختصاصیت گونه ای دارند. برودیسیت [۳۸]و همکاران(۲۰۰۸) گزارش کردند که حدت در ماهی قزل آلای رنگین کمان از طریق توانایی VHSV برای ورود و انتقال از سلول های اپیتلیال آبشش تعیین می شود(Brudseth et al., 2005). کوولیت [۳۹]و همکاران (2007a) قبل از آن نشان دادند که یک ارتباطی بین تکثیر ویروس VHS در بافت های باله و مرگ و میر پس از مواجهه وجود دارد(Quillet et al., 2007). هرماچی [۴۰]و همکاران(2006) اهمیت سلول های پایه باله را در تکثیر اولیه رابدونوداویروس مرتبط با IHN نشان دادند(Harmache et al., 2006). هیچ شکی وجود ندارد توانایی ویروس در عفونت سلول های اولیه اهمیت اساسی در بروز عفونت ویروسی دارد. مثال هایی از وقوع بیماری نوظهور جدید در قزل آلاهای پرورشی در آب های دریایی نشان دهنده این است که اغلب ویروس های رخدادهای طبیعی دریایی دارای حدت کمی برای قزل آلاها می باشند(Olesen and Skall, 2011b). اسکال[۴۱] و همکاران (۲۰۰۵)پیشنهاد می کند که خصوصیات حدت ویروس VHSV می تواند در اثر رژیم انتخابی آبزی پروری متراکم تغییر یابد(Skall et al., 2005).

[38] Brudeseth
[39] Quillet
[40] Harmache
[41] Skall

فاکتورهای مساعد کننده

به طور معمول در بسیاری از بیماری های ویروسی ماهی ، استرس نقش مهمی را در القا بیماری بازی می کند که باعث وقوع مجدد یا ظهور عفونت از یک عامل می شود. ظهور بیماری VHS به شکل بالینی می تواند نشانگر نقش مداخله گر هورمون استرس کورتیزول و سایر کورتیکو استروئیدها در شروع تکثیر ویروس VHS در کلیه و طحال (بافت های اصلی تولید کننده لکوسیت ها) است (اولسن و اسکال ۲۰۱۱).

عامل مهم در شیوع بیماری، عوامل استرس زا می باشند؛ هورمونهای تخم ریزی، کیفیت پایین آب، حمل و نقل، نقصان درجه حرارت آب، آلودگی آب، تراکم بالای ماهیان در استخر، افزایش میزان غذادهی به ماهیان، کمبود مواد غذایی و یا دستکاری بیش از حد ماهیان، وجود سایر بیماریها در مزرعه نظیر بیماری پرولیفراتیو کلیه، بیماری باکتریایی کلیه، ایکتیوفتریازیس و ...، همگی از طریق سرکوب سیستم ایمنی بدن، می توانند در بروز و گسترش بیماری مؤثر باشند(اولسن ۲۰۱۵).

بسیاری از عوامل، حساسیت به بیماری را تحت تأثیر قرار می دهند. در قزل آلای رنگین کمان به نظر می رسد که عوامل ژنتیکی و سن مهم باشد؛ ماهیان جوانتر حساستر هستند. به طور عموم، ماهیان مسنی که سابقه مواجهه با ویروس را نداشته اند، در صورت ابتلا، دچار تلفات بالا می شوند. بعضی از ماهیان، بدون هیچگونه علائمی از بیماری می توانند مبتلا شوند. میزان بیماریزایی ویروس بسته به جدایه ویروس و شرایط میزبان ، از تغییرات آسیب شناسی جزئی تا مرگ و میر جزئی و یا مرگ و میر بسیار بالا متفاوت است. در ماهی قزل آلا، دفع ویروس به طور فزاینده ای مدتی کوتاه قبل از بروز علائم اولیه بالینی به حد اکثر می رسد؛ به طور مثال، در دمای ۱۰ تا ۱۲ درجه سانتیگراد و شرایط تجربی، دفع ویروس، ۳ تا ۵ روز پس از ورود ویروس به بدن، شروع و در روزهای ۷ تا ۸ پس از ورود ویروس به بدن، به حداکثر می رسد و پس از آن، برای چند هفته ادامه می یابد. دفع ویروس، می تواند تا ۳ ماه پس از عفونت، در دمای زیر ۳ درجه، طول بکشد، در حالی که در دمای بالای ۱۵ درجه، ماهیها خیلی سریعتر، عاری از ویروس خواهند شد. عفونت با ویروس عامل بیماری در مراحل حساس زندگی در هچری ماهی قزل آلا با علائم بالینی همراه است و در این حالت مرگ و میر مشخص و خیلی زود پس از عفونت اتفاق می افتد.(اولسن ۲۰۱۵)

همه گیر شناسی:

- **دامنه میزبانی**

در طول دو دهه اخیر ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی از تعداد رو به افزایش گونه های ماهی آب شیرین و دریاها جداسازی شده است(جدول های ۱-۲و۲-۲). محتمل است که ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی در جمعیت های ماهیان در مناطق وسیعی از مناطق گرم نیمکره شمالی بومی شده باشد. همچنین ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی از تقریبا ۸۰ گونه مختلف ماهی در نیم کره شمالی شامل امریکای شمالی و آسیا و اروپا جدا شده است. تعدادی ازگونه ها، تحت شرائط تجربی به ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی حساس بوده اند. تعداد گونه های میزبانی احتمالی با افزایش پایش ها در حال افزایش است. اگرچه حساس ترین گونه ماهی پرورشی قزل آلای رنگین کمان است ، ژئوتیپ یک-آ ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی باعث مرگ و میر ماهی فلاندرژاپنی و توربوت پرورشی می شود. در سالیان اخیر مرگ و میر

گسترده در ماهیان وحشی در حداقل ۲۸ گونه ماهی آب شیرین در دریاچه بزرگ ناحیه بین امریکا و کانادا اتفاق افتاده است. تمـام جدایه های ویروسی VHS از این طغیان ها به علت ژنوتیپ چهار-ب ویروسی بوده است.(OIE,2016)

جدول ۱-۲.گونه ماهیانی که شواهد قطعی مبنی بر حساسیت آنها وجود دارد.

Susceptible according to European Food Safety Authority (EFSA) rules			
Order	Family	Common name	Latin name
Salmoniformes (salmon)	*Salmonidae* (salmonids)	Rainbow trout / Steelhead trout	*Oncorhynchus mykiss*
		Chinook salmon	*Oncorhynchus tshawytscha*
		Coho salmon	*Oncorhynchus kisutch*
		Atlantic salmon	*Salmo salar*
		Brown trout	*Salmo trutta*
		Grayling	*Thymallus thymallus*
		Whitefish[a]	*Coregonus lavaretus*
		Whitefish	*Coregonus* spp.
		–[a]	*O. mykiss* × *O. kisutch*
		–[a]	*O. mykiss* × *S. fontinalis triploid*
		–[a]	*O. mykiss* × *S. alpinus triploid*
Esociformes	*Esocidae*	Muskellunge	*Esox masquinongy*
		Northern pike	*Esox lucius*
Clupeiformes	*Clupeidae*	Atlantic herring	*Clupea harengus*
		Pacific herring	*Clupea pallasii*
		South American pilchard	*Sardinops sagax*
		European sprat	*Sprattus sprattus*

ادامه جدول ۱-۲ اقتباس از Code of Aquatic Animal , OIE2016

Susceptible according to European Food Safety Authority (EFSA) rules			
Order	**Family**	**Common name**	**Latin name**
Gadiformes (cod)	*Gadidae*	Atlantic cod	*Gadus morhua*
		Poor cod	*Trisopterus minutus*
		Whiting	*Merlangius merlangus*
		Blue whiting	*Micromesistius poutassou*
		Norway pout	*Trisopterus esmarkii*
		Alaska Pollock	*Theragra chalcogramma*
	Lotidae (hakes and burbots)	Fourbeard rockling	*Enchelyopus cimbrius*
		Burbot	*Lota lota*
	Merlucciidae	(North) Pacific hake	*Merluccius productus*
Pleuronectiformes (flatfish)	*Pleuronectidae*	Dab	*Limanda limanda*
		Flounder	*Platichthys flesus*
		European plaice	*Pleuronectes platessa*
		Greenland halibut	*Reinhardtius hippoglossoides*
		Atlantic halibut[a]	*Hippoglossus hippoglossus*[b]
	Scophthalmidae	Turbot	*Scophthalmus maximus*
	Paralichthyidae	Japanese flounder	*Paralichthys olivaceus*
Osmeriformes	*Argentinidae*	Lesser argentine	*Argentina sphyraena*
	Osmeridae (smelt)	Surf smelt	*Hypomesus pretiosus*
Perciformes (perch-like)	*Ammodytidae*	Pacific sand lance	*Ammodytes hexapterus*
		Sand eel	*Ammodytes* spp.
		Pacific sand eel	*Ammodytes personatus*
	Gobiidae	Sand goby	*Pomatoschistus minutus*
		Round goby	*Neogobius melanostomus*
	Embiotocidae	Shiner perch	*Cymatogaster aggregata*
	Sciaenidae	Freshwater drum	*Aplodinotus grunniens*
	Scombridae	Chub mackerel, Pacific mackerel	*Scomber japonicus*
	Percidae (perch)	Yellow perch	*Perca flavescens*[c]
	Moronidae (temperate bass)	European seabass[e]	*Dicentrarchus labrax*
Gasterosteiformes	*Gasterosteidae*	Three-spined stickleback	*Gasterosteus aculeatus*
Cypriniformes (carp)	*Cyprinidae* (minnows or carp)	Fathead minnow[a]	*Pimephales promelas*[d]
Petromyzontiformes (lamprey)	*Petromyzontidae* (lamprey)	European river lamprey	*Lampetra fluviatilis*[a]

a. Infection trial, immersion;
b. Skall et al., 2005;
c. Kane-Sutton et al., 2010;
d. Al-Hussinee et al., 2010;
e. Gadd et al., 2010.

قزل آلای رنگین کمان بطور اختصاصی به ویروس VHS حساسیت دارد و علائم کلاسیک بیماری را در بچه ماهیان تازه به تغذیه رسیده نشان می دهند. بیماری از نظر تاریخی، عمدتاً با ماهیان آب شیرین همراه بوده، تاریخچه بیماری، بیشتر به آزاد

ماهیان آب شیرین در غرب اروپا باز می گردد و مدارک مربوط به بیماریزایی آن در آزاد ماهیان پرورشی از سال ۱۹۵۰ میلادی گزارش شده است. نکته قابل توجه آن که تا سال ۱۹۸۸ میلادی این بیماری به ماهیان آب شیرین اختصاص داشت، اما، در حال حاضر، بیش از ۹۰ گونه از ماهیان آب شیرین و ماهیان دریایی از جمله قزل آلای رنگین کمان، قزل آلای قهوه ای، قزل آلای خال قرمز، ماهی آزاد اطلس، ماهی آزاد دانوب، آزاد ماهی نقره ای، آزاد ماهی سیاه، ماهی بلند باله، ماهی سفید جویباری، انواع سفید ماهیان[۴۲] ، ماهی پهن خوراکی، شاه ماهی و شاه ماهی کوچک، ماهی روغن کوچک، اردک ماهی، شگ ماهی اطلس و آرام، کیلکای اروپایی، ماهی روغن اطلس، آلاسکا پولاک، چرب ماهی[۴۳]، ماهی هیک آرام، کفشک، هالیبوت اطلس، توربوت، کفشک ژاپنی، مارماهی، گوپی، سوف شاینر، شوریده آب شیرین، ماکرل اقیانوس آرام، سوف زرد، سی باس اروپایی، مینوی سرچرب و دهان گرد رودخانه ای و ...، در نقاط مختلف نیمکره شمالی نسبت به بیماری حساس هستند (OIE,2016).

این ویروس در قرن گذشته از طریق آمریکا وارد اروپا شده است. فرضیات در مورد چگونگی استقرار ویروس جالب می باشد. به طوری که قزل آلا در ابتدا در سال ۱۸۷۹ به فرانسه و سپس دانمارک وارد گردید. قزل آلاهای موجود در قفس های دریایی هم نسبت به ویروس حساس هستند. وقوع رخدادبیماری با ۸۵٪ مرگ و میر را طی ۸۰ روز پس از انتقال ماهی فزل آلا به آب دریا گزارش شده است .سایر گونه های قزل آلا در شرایط طبیعی نسبت به ویروس VHS حساس هستند این گونه ها شامل قزل آلای قهوه ای۴۴ و قزل آلای دریاچه ای۴۵ و در جنس سالمو۴۶ گونه های سالمون آتلانتیک ۴۷ قزل آلای قهوه ای و قزل آلای طلائی۴۸ نسبت به ویروس حساس هستند. ماهیان موجود در اب شیرین رودخانه ها و دریاچه ها و آبراه ها در آلمان و سوئد شامل گونه های اردک ماهی۴۹ ، آویشن ماهی ۵۰ ، ماهی سفید ۵۱به طوقابل ملاحظه ای حساس هستند.از آنجائیکه سالمون آتلانتیک نسبت به عفونت تجربی از طریق عفونت داخل پریتونیوم حساس است در این خصوص باید بین میزبان طبیعی VHS و میزبان تجربی تفاوت قائل شد سالمون آتلانتیک در آب های سواحل اروپائی به عنوان میزبان طبیعی در نظر گرفته نمی شود و تاکنون فقط به عنوان مدل تجربی عفونت به حساب می آید لیکن گذشت زمان مشخص خواهد کرد که آیا سویه های دریائی VHS می تواند برای سالمون آتلانتیک پاتوژن باشد یا خیر ؟ سایر گونه های ماهیان دریائی پرورشی نظیر سی باس دریائی۵۲ و توربوت در مناطق مدیترانه حساسیت دارند این موضوع به صورت تجربی نشان داده شده است تکثیر و ازدیاد ویروس در هر دو گونه نشان داده شده است و هیستوپاتولوژی آن هم نشان داده شده است. علائم کلینیکی بیماری در توربوت های پرورشی در رخداد VHS بوسیله اسکاتفلد۵۳(۱۹۹۱) و در اسکاتلند در جزایر گیقا بوسیله راس۵۴ و همکاران (۱۹۹۴) توصیف شد. در مورد

---

[42] Coregonus sp.
[43] Lota lota
[44] Salmo trutta m. fario
45 Salvenlinus Fontinalis
[46] Salmo
[47] Atlantic salmon (S.salar)
[48] Oncorhynchus aguabonita
[49] Esox lucius
[50] Grayling(Thymallus thymullus)
[51] whitefish(Coregonus sp.)
[52] Sea bass(Dicentrachus Labrax)
[53] Schotfeldt
[54] Ross

اسکاتلند که در بزرگترین مرکز پرورش درون تانک توربوت های با سن ۳ سال نشان داده شد که مرگ و میر بالا در ماه هائی از دوره پرورش غالب است(Olesen and Skall, 2011).

درخصوص توزیع گسترده ویروس VHS و تنوع میزبانی آن جداسازی ویروس در سالمونیدهای آنادرموس در سال۱۹۸۸ در سواحل غرب اقیانوس آرام در آمریکا یک یافته قابل ملاحظه بود. به طوری که در کوهو سالمون ۵۵ مهاجر و چینوک سالمون ۵۶ نشان داده شد.

در هچری ملی ماهی ماکه[۵۷] در ایالت واشنگتن آمریکا جائی که ماهی های مهاجر نمونه برداری می شوند اولین سویه VHSV مربوط به اقیانس آرام ۵۸ ،به اسم ماکه جداسازی، نامگذای و تشخیص داده شد. جدا سازی ویروس سویه اقیانوس آرام غیر منتظره بود و نویسندگان را به این سمت هدایت کرد که VHSV دارای منشاء دریایی بوده و گسترش جهانی دارد. همچنین سویه دریایی اقیانوس آرام از لحاظ محتویات ژنتیکی از سویه های تثبیت شده اروپایی قزل الای آب شیرین متفاوت است(Brunson et al., 1989)با وجود این که طبق مطالعه صورت گرفته توسط کولیت و همکاران(۲۰۰۷)، پتانسیل خوبی برای ایجاد نژادهای مقاوم ماهی قزل آلا به بیماری وجود دارد، اما، تاکنون سویه ماهی قزل آلای رنگین کمان مقاوم به بیماری به صورت تجاری تولید نشده است. قزل آلای رنگین کمان، میزبان اولیه ویروس بوده، نسبت به بیماری بسیار حساس است، در صورتی که قزل آلای قهوه ای، نسبت به آن مقاومتر است(Quillet et al., 2007). همچنین، ماهی قزل آلای خال قرمز۵۹ و ماهی آزاد جویباری۶۰ و اردک ماهی نسبت به بیماری مقاومتر هستند. ماهی آزاد دریاچه ای، به طور تجربی حساس تشخیص داده شده در حالی که ماهی اسکوالیوس سفالوس۶۱ و نوعی ماهی کلمه[۶۲] مقاوم هستند؛ این مقاومت همچنین در ماهی کپور معمولی[۶۳]تشخیص داده شده است. بیماری، در آزاد ماهیان پرورشی اقیانوس آرام و نیز در مزارع دریایی پرورش ماهی نیز گزارش شده است(Olesen and Skall, 2011a).

- گستره جغرافیائی بیماری

واگیریهای VHS، در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان، به طور عمده در اروپا اتفاق می افتد و در این قاره جزء بیماریهای بسیار خطرناک محسوب می گردد. تا سال ۲۰۱۶ بیماری هنوز در مزارع قزل آلای قاره اروپا دیده می شود. در دهه ۱۹۹۰ میلادی VHS در ماهیان کفشک در مزرعه پرورش ماهیان دریایی در اسکاتلند ، انگلیس و در سال۱۹۹۶ از ایرلند گزارش گردید. اشکال دریایی ویروس از آلاسکا و واشنگتن در ایالات متحده آمریکا شناسایی شده اند همچنین در اقیانوس آرام اشکال دریایی ویروس در دریای شمالی در ماهی کاد به همراه زخم های پوستی و در ماهی هادوک[۶۴] به همراه اریتروما۶۵ دیده شده است. توزیع جغرافیایی

[55] Coho salmon(O.kisutch)
[56] Chinook salmon(O.tshnytscha)
[57] Makah
[58] Pacific-type
[59] Salmo trutta
[60] Salvelinus fontinalis
[61] Squalius cephalus
[62] Leuciscus rutilus
[63] Cyprinus carpio
[64] Melanogrammus aeglefinus

این نکته را تأکید می کند که توزیع VHSV بین خطوط عرض جغرافیایی ۳۰ درجه تا ۶۰ درجه ممکن است با حداقل و حداکثر دمای مورد نیاز برای تکثیر ویروس مرتبط باشد.((Olesen and Skall, 2011a)، OIE ، ۲۰۱۶)

ویروس VHSV تاکنون در نیمکره جنوبی در جاهائی که آبزی پروری ماهیان سالمونیده انجام شده است نظیر استرالیا ، شیلی ، نیوزلند و آفریقای جنوبی یافت نشده است.(OIE 2016)

- ســـــن

قزل آلاهای پرورشی در سنین ۰,۳ تا ۳ گرم به عفونت بسیار حساس هستند. در زمانی که بافت های هدف قسمت عمده وزن بدن را شامل می شود مرگ و میر ۱۰۰-۸۰٪ ناشی از سویه های حاد در دمای مناسب تکثیر ویروس ۱۲-۹ درجه سانتی گراد معمول می باشد. به علاوه بچه ماهیان انگشت قد و در حال رشد هم به بیماری حساس هستند اما میزان مرگ و میر پایین تر است(در حدود ۵۰-۱۰٪ برای سویه های حاد) و وضعیت عصبی مزمن در این ماهی ها معمول تر است. این ماهی در تمام سنین حساس است و معمولاً، ماهیان پرواری(ماهیان بازاری ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرمی) هم مبتلا می شوند. با این حال، در ماهیان کمتر از ۶ ماه سن و انگشت قد (۵ تا ۸ سانتیمتری)، بیماری بیشتر و شدیدتر بوده و میزان مرگ و میر بالاتر است. بیشترین تلفات در ماهیان بالای وزن ۵-۳ گرم و بالای ۲ ماه سن می باشد. به طور کلی، بنا بر ذکر بعضی منابع، نوزادها و ماهیان مولد، معمولاً، نسبت به بیماری مقاوم هستند و به دلیل تقویت سیستم ایمنی بدن توسط ویروس عامل در مناطق بومی، بیماری به طور عمده در ماهیان جوان که سابقه ابتلا به بیماری را نداشته اند، اتفاق می افتد. ماهیان یک ساله، اغلب شکل ملایم بیماری را با تلفات کم خواهند داشت و ماهیان بالای دو سال سن، تقریباً به طور کامل به بیماری مقاومند(Olesen and Skall, 2011a; OIE, 2016).

- دمـــا

سپتی سمی هموراژیک ویروسی بیماری آب های سرد با میانگین ۱۲-۲ درجه می باشد.. دماهای بالاتر از ۱۵ درجه سانتی گراد اثرات مهاری برای رشد ویروس دارند. جوجنسن[۶۶] (۱۹۸۲) نشان داد که دما با طول دوره زمانی عفونت در قزل آلاهای پرورشی رابطه معکوس دارد(JØRgensen, 1982). نیوکرچ [۶۷](۱۹۸۵) نشان داد که عفونت برای ۴۰۰-۳۰۰ روز در قزل آلاهای پرورشی در ۴ درجه باقی می ماند. بیشترین رخداد بیماری در دمای آب ۲ تا ۲۰ و بخصوص ۴ تا ۱۴(آبهای سرد یا خنک) و بیشترین تلفات در دمای ۹ تا ۱۲ درجه سانتیگراد می باشد. طغیانهای بیماری می تواند در خلال سال اتفاق بیفتد، اما، تغییرات دما در بهار و پاییز همراه با تغییرات سیستم ایمنی بدن ماهیان و عوامل مستعد کننده مانند تغذیه نامناسب و بروز عفونتهای انگلی ممکن است شرایط مناسب را جهت رخداد بیماری فراهم نماید. شدیدترین اپیدمی بیماری در اواخر زمستان و اوایل بهار، زمانی که دمای آب بالا می رود، دیده می شود(Noga, 2011; Olesen and Skall, 2011b; OIE, 2016).

VHS، یک بیماری تقریباً فصلی است و بیشتر در پاییز و زمستان و در دمای ۱۰(۱۴-۴) درجه سانتیگراد اتفاق می افتد. به طور معمول، شدیدترین همه گیریهای بیماری در زیر دمای ۸ تا ۱۰ درجه سانتیگراد، روی می دهد. در آبهای با دمای ۱۵ تا ۱۸

---

[65] Erythroma
[66] Jorjensen
[67] Neukirch

درجه سانتیگراد، بیماری در زمان کوتاهتر و با حدت متوسط ظاهر می شود و تلفات تجمعی کمی خواهد داشت(شیب ملایم تلفات). بیماری، بندرت در دماهای بالا اتفاق می افتد. ویروس، به طور معمول، خاصیت بیماریزایی خود را بالاتر از دمای ۲۰ درجه سانتیگراد از دست می دهد، البته سروتیپهایی که برای تهیه واکسن به کار می روند، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نیز زنده مانده، قادر به رشد و تکثیر هستند. کاهش دما به ۱ تا ۵ درجه سانتیگراد، عموماً، باعث طولانی شدن دوره بیماری شده، با میزان مرگ و میر روزانه کم و مرگ و میر تجمعی بالا تظاهر می یابد. قطع غذا، میزان تلفات را بشدت پایین می آورد. گاهی اوقات، وجود بیماری در بچه ماهیان انگشت قد در تابستان گزارش شده است. به نظر می رسد ماهیان قزل آلای شفا یافته از بیماری در برابر عفونت مجدد بیماری مقاومتر هستند و ممکن است بعضی از آنها تبدیل به حاملین بدون علامت بیماری شوند(Noga, 2011; Olesen, 2015).

دوره کمون بیماری به دمای آب، شرایط استرس زا، مقاومت و سن ماهیان، حدت ویروس و دز ویروس آلوده کننده بستگی دارد و به طور متوسط ۱-۳ هفته بعد از شروع عفونت طول می کشد. بقای ویروس در آب و رسوبات، به میزان بسیار زیادی به دما و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب بستگی دارد. ویروس، به دمای بالا و مواد شیمیایی حساس است. در صورت افزوده شدن مواد آلی به آب مانند مایعات تخمدانی و فرآورده های خونی مثل سرم گاوی، ویروس، مدت طولانیتری زنده می ماند. بقاء ویروس در محیط استخر کوتاه است. ویروس عامل، حداقل به مدت ۱۴ روز در آب زنده می ماند. ویروس در دمای ۵ درجه سانتیگراد و پائینتر تا ۳ ماه زنده خواهد ماند(Noga, 2011; Olesen, 2015).

علائم بالینی و ضایعات ظاهری

به طور کلی در بیماریهای ویروسی ماهیان، سه نشانه مشترک وجود دارد که عبارتند از : تیرگی رنگ بدن، اگزوفتالمی یا بیرون زدگی چشمها و آسیت یا آب آوردگی و انبساط شکم. در بیماری VHS، علاوه بر موارد یاد شده، خونریزی وسیع نیز دیده می شود که از این نظر تا حدودی با سایر بیماریهای ویروسی متفاوت است. بیماری ممکن است به سه شکل حاد- فوق حاد، مزمن- تحت حاد و عصبی(تأخیری) ظاهر شود، اما، اغلب در ماهیان آب شیرین به سه شکل حاد، مزمن و عصبی دیده می شود (Noga, 2011; Olesen, 2015).

- شکل حاد

در این شکل که به طور معمول در اوایل بهار دیده می شود، ماهیان مبتلا، بی اشتها شده، شنای غیر طبیعی(چرخشی و عمودی) دارند و تلفات، بسیار سریع و شدید است. ماهیان بیمار، بی حس و بی حال بوده، به کناره های استخر که جریان آب آرام و کمتر است، می روند و در استخرهای خاکی، مبتلایان تمایل دارند به نواحی دارای رویش گیاهی پناه بیاورند. برخی ماهیان، در نواحی خروجی یا گوشه های استخر، آرام و بی تفاوت به محیط اطراف دیده می شوند. ماهیان بیمار، به طور قابل توجهی تیره تر از حد طبیعی به نظر می رسند و ممکن است بیرون زدگی چشمها(یک طرفه یا دو طرفه)، تنفس سریع، نشانه های کم خونی و نیز خونریزیهای نقطه ای و رگه ای روی سطح آبششها دیده شود.

به دلیل وجود خونریزیهای وسیع، این شکل از بیماری به ابولای[۶۸] آبزیان معروف است؛ خونریزی وسیع در پوست، قاعده باله ها(گاهی اوقات قاعده باله های سینه ای به رنگ مایل به قرمز)، کاسه چشم و بافت ملتحمه دور چشم(مانند دو چراغ قرمز در مقابل نور) وجود دارد. در اندامهای داخلی ممکن است خونریزیهای فراوانی مشاهده شود. این خونریزیها در کبد، کلیه ها، کیسه شنا، گنادها، چربی مزانتر، دیواره صفاق وعضلات بخصوص عضلات انتهایی و پشتی قابل مشاهده است. کبد، پرخون و حاوی لکه های خونریزی، کلیه ها و طحال نیز متورم و پرخون و روده ها خالی از غذا، ملتهب و پرخون می باشند. اسیدیته روده ها به ۶ تا ۷ می رسد، در صورتی که در حالت طبیعی ۱ تا ۲ می باشد. وجود خونریزی در سرتاسر اندامهای داخلی بدن آزاد ماهیان، همیشه زنگ خطری برای امکان وجود بیماری VHS می باشد(Noga, 2011; Olesen, 2015).

- **شکل مزمن**

در این شکل که متعاقب شکل حاد ایجاد می شود، درصد تلفات پائینتر است؛ تلفات روزانه، کم ولی در طول دوره زمانی پرورش در مجموع زیاد می باشد. ماهیان مبتلا، بی حال، کم اشتها، تیره رنگ و تقریباً سیاه شده، بیرون زدگی چشم شدید و معمولاً دو طرفه، کم خونی شدید و تغییر رنگ در آبششها به رنگ گلی کمرنگ و یا سفید خاکستری در اثر کم خونی و خونریزی و عدم تعادل درشنا ازعلائم عمده این بیماری می باشد. کبد، رنگ پریده و دارای خونریزی پتشی و کلیه ها خاکستری رنگ به نظر می رسند. خونریزی در این شکل خفیفتر بوده، در برخی موارد حتی ممکن است دیده نشود. گاهی اوقات، خونریزیهای خفیف در کیسه شنا به چشم می خورد. کیسه شنا، کبد، کلیه ها و طحال ممکن است بزرگ شده یا تمام محوطه شکمی از مایعات پر شود(استسقاء : آب آوردگی شکم)؛ در این ماهیها، کلیه ها، متورم و بد رنگ و شکم، برجسته شده، حالت ادم بخوبی مشاهده می شود؛ به دلیل اتساع شکم و ادم جیب فلسها، دراپسی[۶۹] یا سیخ شدن فلسها وجود دارد(Noga, 2011; Olesen, 2015).

- **شکل عصبی**

در این شکل از بیماری(شکل انتهایی یا تأخیری) که شکل پایانی یک همه گیری می باشد و تنها با مشاهده حرکات ماهیان در آب قابل تشخیص بوده، تلفات کمتری از شکل مزمن نیز دارد، علائم عصبی، تشنجی و انقباضی بیشتر از سایر علائم این بیماری مشاهده می شود. امکان تاب برداشتن بدن ماهیان(لردوزیس[۷۰] و اسکولیوزیس[۷۱]) وجود دارد. ماهیهای مبتلا، از نظر ظاهری سالم بوده، شنای غیر طبیعی داشته، گاهی به دور خود می چرخند و یا به سمت بستر حوضچه یا مرکز نرده های خروجی آب حرکات مارپیچی(به دلیل تمایل ویروس برای حمله به مغز) از خود نشان می دهند و یا بر روی یک پهلو همراه با حرکات متشنج و انقباضی و گاهی روی آب شنا می کنند و یا بدون حرکت در گوشه ای از استخر می ایستند. فلاشینگ یا حرکت ناگهانی روی پهلو که باعث تاباندن ناگهانی نور می گردد، نیز وجود دارد. درصد مبتلایان به این شکل از بیماری، پایین بوده، مرگ آنها در عرض چند روز فرا می رسد. بنابراین، درصد مرگ و میر نیز پایین می باشد. کم خونی وجود نداشته، این ماهیان را معمولاً، با هیچگونه علامت خارجی جز شکم جمع و منقبض و آبششهای با رنگ قرمز طبیعی نمی توان از ماهیان سالم تشخیص داد. خونریزی در اندامهای داخلی و نیز به صورت نقاط پتشی در کیسه شنا، دیواره صفاق، چربی مزانتر، عضلات و دیواره شکمی وجود داشته، دستگاه گوارش،

[68] Ebola
[69] Dropsy
[70] Lordosis
[71] Scoliosis

خالی از غذا است. کبد کمرنگ و دارای مناطق پرخون و نقطه نقطه ، کلیه ها بشدت قرمزتر از حالت طبیعی و متورم و طحال بزرگ و پرخون می باشد(Noga, 2011; Olesen, 2015).

آسیب شناسی

از نظر آسیب شناسی، همانطوری که از نام بیماری مشخص است، VHS، یک بیماری خونریزی دهنده بوده، مهمترین نشانه های داخلی آن، خونریزی پراکنده بویژه در بافت ملتحمه چشم، عضلات، چربیهای احشایی، کیسه شنا، صفاق، قلب و... است. با این حال، تغییرات دژنراتیو و نکروز از علائم پاتولوژیک اصلی در این بیماری بوده که در بسیاری از ماهیان آلوده یافت می شود. اندامهای هدف در این بیماری شامل کلیه، کبد، قلب و طحال می باشد که به مقدار فراوانی دارای ویروس هستند. همچنین، ویروس به میزان فراوان در پوست ماهی تجمع یافته که باعث گسترش و انتقال بیماری می گردد. در مراحل مزمن بیماری، تیتر ویروس در مغز بالا می رود. تغییرات هیستوپاتولوژیک و نکروز عمده به طور معمول، در کبد، کلیه ها، طحال و ماهیچه های اسکلتی دیده می شود. بافتهای آبششی و روده ای اغلب طبیعی هستند، اما آبششها ممکن است تیغه های آبششی ضخیم باشند . در مقطع آسیب شناسی، تجمع گلبولهای قرمز توأم با پلاسمای منعقد شده دیده می شود که به احتمال زیاد ناشی از پاره شده مویرگهاست(Olesen and Skall, 2011a; Roberts, 2012).

شکل حاد : در شکل حاد بیماری خونریزی بوفور مشاهده می شود، در حالی که در شکل مزمن خونریزی کمتر مشاهده میگردد. گاهی اوقات در شکل اخیر، خونریزیهای خفیف در کیسه شنا به چشم می خورد. کبدپرخون و به رنگ یاقوتی تیره و تار بوده، در حالی که در حالت مزمن، بسیار رنگ پریده و مایل به خاکستری گاهی همراه با خونریزیهای پتشی است. کلیه ها، اندام هدف ویروس محسوب می شوند و آسیب بافت خونساز کلیه(کلیه قدامی) بسیار شدیدتر از ناحیه خلفی آن است. کلیه، در شکل حاد، به رنگ قرمز بوده، معمولاً نازک است، در حالی که در شکل مزمن به رنگ خاکستری و تا حدودی زرد تمایل دارد و حجیم و ناصاف است. سایر اندانهای ماهیان مبتلا، نشانه های مشخصی از خود نشان نمی دهند و در شکل عصبی نیز در بسیاری موارد یافتن ضایعات کلان و ریز غیر ممکن است(Olesen and Skall, 2011a; Roberts, 2012).

در شکل حاد بیماری، سینوزوئیدهای کبد متسع و پرخون همراه با خونریزیهای وسیع احتمالی، اما در شکل مزمن سینوزوئیدها متسع وحاوی پلاسمای منعقد شده و تعدادی گلبول قرمز همولیز شده و رنگدانه های صفراوی و هماتوئیدین می باشند. در عضلات، نفوذ سلولهای آماسی و گهگاهی تجمع گلبولهای قرمز صورت می گیرد، ولی فیبرهای عضلانی، به طور معمول، آسیب نمی بینند. تغییرات بافت خونساز طحال شبیه کلیه ها می باشد. در لوله های مالپیگی کلیه ها، ضایعات نکروزی مانند حفره دار شدن سیتوپلاسم، پیکنوز، کاریولیز، جدا شدن اپی تلیوم مجاری کلیوی، ادم عمومی مشاهده می شود. در شکل مزمن بیماری، به افزایش یاخته های لنفوئیدی تک هسته ای در بافت بینابینی بوفور برخورد می گردد. رنگدانه قهوه ای که به طور معمول به صورت دانه هایی در ملانوماکروفاژهای شده دیده می شود، به دو شکل تحلیل رفته قطعه قطعه و یا پراکنده در بین یاخته ها مشاهده می گردد(Olesen and Skall, 2011a; Roberts, 2012).

شکل مزمن : تلفات خفیف در ماهیان مبتلا ، تورم شکم، اگزوفتالمی، افزایش شدید حجم کلیه و بزرگ شدن طحال دیده می شود. درآسیب شناسی، هیپرپلازی یا افزایش شدید بافت لنفوئید بینابینی کلیه، حجیم شدن پولپ طحال و پیدایش فراوان اشکال غیر بالغ گلبولهای سفید در خون آشکار می گردد. در بافتهای خونساز کلیه و طحال سلولهای لنفوئیدی تک هسته ای دچار

هیپرپلازی می شوند. در شکل پیشرفته بیماری علاوه بر افزایش شدید مراکز ملانوماکروفاژ ، تخریب و پخش شدن رنگدانه ها دیده می شود. لکوپنی و کم خونی از دیگر علائم ماهیان مبتلا می باشد. به طور معمول گنجیدگیهای داخل هسته ای و داخل سیتو پلاسمی در برخی سلولها از جمله سلولهای کبدی دیده می شود بافت پانکراس، برخلاف بیماریهای نکروز عفونی بافتهای خونساز(IHN) و نکروز عفونی پانکراس(IPN)، تغییرات آسیب شناسی کمتری را بروز می دهد. در حاملین بدون علائم بالینی بیماری، علائم هیستوپاتولوژیک مشخصی دیده نمی شود(Olesen and Skall, 2011a; Roberts, 2012).

تشخیص تفریقی

بیماریهای ویروسی مانند IHN، IPN و طاعون اردک ماهی معمولاً در آزادماهیان و از جمله در ماهیان قزل آلا ایجاد بی اشتهایی، تیرگی پوست، اگزوفتالمی، آسیت، شنای چرخشی و مراتبی از خونریزی می نمایند. همچنین بیماریهای باکتریایی مانند استرپتوکوکوزیس و یرسینیوزیس در ماهیان قزل آلا باعث بی اشتهایی، تیرگی پوست، اگزوفتالمی، آسیت، خونریزی و عدم تعادل می گردند. بیماریهای انگلی نیز می توانند علائم مشابهی ایجاد کنند. IHN معمولاً، در ماهیان با اندازه ۱ گرم و IPN علاوه بر آن در سنین بالاتر از ۱ گرم نیز دیده می شود و در هر دو آنها رشته های مدفوع آویزان از مخرج وجود دارد. استرپتوکوکوزیس معمولاً در تابستان و دمای بالای آب اتفاق می افتد و در یرسینیوزیس، نقاط خونریزی علاوه بر چشم، معمولاً، در فک دهان و حلق وجود دارد. تشخیص قطعی بیماری های فوق از طریق آزمایشات سرولوژیک و آنتی ژنیک، کشت سلولی و بررسیهای هیستوپاتولوژیک میسر می باشد(Noga, 2011).

تشخیص :

- **روش کلینیکی**

بسیاری از علائم کلینیکی برای قزل آلاهای رنگین کمان در بالا توصیف شده است. علائم کلینیکی کلیدی سطحی آن شامل آبشش های رنگ پریده ، تجمع ماهیان آسیتی یا آسیت که باعث تورم شکم می گردد ، خونریزی عنبیه چشم و اگزوفتالمی در یک یا هر دو چشم ، کست های مدفوعی که ممکن است شفاف زرد یا خون آلود باشد. تشخیص اولیه بیماری با مشاهده علائم بالینی و بروز تلفات در میان گونه های حساس بویژه در ماهیان انگشت قد یا ماهیان جوانتر در یک مزرعه و بخصوص در بین ماهیان قزل آلا، طی دوره زمانی کاهش درجه حرارت آب مزرعه یا در مزارع با دمای پایین آب صورت می گیرد. بروز خونریزی پتشی در سرتاسر پوست، عضلات و اندامهای داخلی در تشخیص ابتدایی بیماری کمک کننده است؛ یک علامت خیلی معمول در بیماری VHS، بروز خونریزی پتشی در عضلات پشتی است که بررسی آن اهمیت ویژه ای دارد. همچنین با مطالعه آسیب شناسی بافتهایی مانند روده، کلیه و کبد می توان به تشخیص بیماری نزدیکتر شد؛ در این مرحله، باید به ضایعات بافتی مخاط روده توجه نمود، زیرا این ضایعات بافتی در بیماری VHS بندرت اتفاق می افتد، در حالی که در بیماری نکروز عفونی بافتهای خونساز(IHN)، مشخصات خاص خود را دارد

در ماهیان دارای شنای آزاد علائم رفتاری ممکن است در شکل های تأخیری عصبی VHS دیده شود که شامل فلاشینگ [72] ، پرش و شنای چرخشی به دلیل التهاب و تحریک بافت عصبی آلوده باشد(Noga, 2011; Olesen, 2015).

- **کشت**

برای کشت ویروس از انواع تیره های سلولی ماهی، خزندگان و پستانداران استفاده می کنند، اما، تیره های سلولی ماهی به دلیل مقاومت بیشتر به دمای پایین، نتایج بهتری می دهند. در ماهیان حامل بهبود یافته و به ظاهر سالم، جداسازی ویروس بسیار سخت است. ویروسهای حدت دار از طریق مدفوع دفع می شوند، اما، برخلاف بیماری نکروز عفونی پانکراس(IPN) در بیماری VHS، استفاده از مدفوع برای جداسازی ویروس بی فایده است. ویروس را در شکل بالینی بیماری می توان از تمامی بافتها جدا کرد. ویروس این بیماری را می توان از هموژنیزه کردن اندامهای داخلی، فرآورده های جنسی(مایعات تخمدانی و بیضه ها) و ادرار ماهی جدا نمود. این ویروس، بندرت از خون و ترشحات صفاقی قابل جداسازی است. میزان ویروس در نواحی قدامی کلیه و طحال، بیشتر از کبد، قلب و عضلات است. در شکل مزمن، تیتر ویروس در مغز می تواند افزایش یابد. استفاده از نمونه های مغز ماهی در حاملان بهبود یافته و بدون علائم بالینی بیماری توصیه می شود(Olesen and Skall, 2011b).

ویروس، در تیره های سلولی BF2، CHSE214، RTM، RTG2، FHM، CAPI، EPC، STE137 و نیز برخی تیره های سلولی پستانداران مانند GLI، رشد و تکثیر پیدا می کند، اما، استفاده از RTG2 نتایج بهتری می دهد. همچنین، تیره سلولی BF2 محیط بسیار مناسبی برای کشت سویه های اروپایی جداشده از ماهیان آب شیرین است. اگر از تیره سلولی RTG2 استفاده شود، رقیق کردن مایه تزریقی به منظور جلوگیری از اثرات مهاری انترفرون، ضروری خواهد بود؛ دمای مناسب تکثیر ویروس در محیط کشت، ۱۵- ۱۴ درجه سانتیگراد و PH مناسب، ۷/۴ تا ۷/۸ بوده، مدت آن، حدود ۱۲ روز طول می کشد که در صورت عدم مشاهده آثار سیتوپاتیک، اقدام به پاساژ ثانویه می گردد. در کشت سلولی ویروس، اینترفرون تولیدی بار ویروسی را کاهش می دهد. آثار سیتوپاتیک ویروس VHS، به صورت نواحی کانونی از سلولهای کروی هستند که سپس شکل این سلول ها کشیده و لیز می گردند. پلاکهای ویروسی قابل تشخیص و با حواشی منظم می باشد. تکثیر ویروس در دمای زیر ۶ و بالای ۲۰ درجه سانتیگراد، بشدت کاهش می یابد. در بعضی منابع، ابعاد ویروس در بررسی با میکروسکوپ الکترونی، ۱۷۷×۶۰ نانومتر ذکر شده است. تیره سلولی بچه ماهی آبشش آبی [73] . (BF-2) و گناد قزل آلا (RTG-2) حساس ترین تیره های سلولی نسبت به سروگروپ جدایه های حدت دار آب شیرین جدا شده از قزل آلاهای رنگین کمان هستند. در بیشتر موارد برای تشخیص قطعی بیماری، روش کشت سلولی همراه با آزمایش ایمونوفلورسانس و استفاده ازآنتی بادی درخشان، پیشنهاد می شود. (اولسن و اسکال ۲۰۱۱ ، OIE2016)

- **تشخیص مبتنی بر آزمایشات سرولوژیکی**

به محضی کهCPE ویروس تشخیص داده شد ، سوپر نانت ویروسی برداشته شده و ویروس از طریق آزمایش های متنوعی تشخیص داده می شود. ویروس را می توان با استفاده از روش های خنثی سازی سرمی [74] بر روی هر تیره سلولی حساسی تشخیص

[72] Flashing
[73] Blue Gill Fry
[74] Imunonutralization test

داد. این کار با استفاده از آزمایش خنثی سازی پلاک[۷۵](PNT) یا یک آزمایش خنثی سازی میکرو تیتر با استفاده از یک دوز ثابت ویروس / رقت های متنوع انتی سرم قابل انجام است.تأئید VHSV بر اساس PNT به طور فوق العاده ای وابسته به فاکتورهای سرمی حساس به حرارت نظیر فاکتورهای کمپلمان می باشد.این پروتئین های سرمی طبیعی اتصالات بین آنتی ژن ـ آنتی بادی را تثبیت می کنند(Olesen and Skall, 2011b; OIE, 2016).

ردیابی آنتی بادی های ماهی یک شاخص مناسب برای تشخیص عفونت های قبلی می باشد لیکن تاکنون سرولوژی به عنوان یک روش تشخیصی رایج برای ارزیابی سطح ویروس در جمعیت ماهیان محسوب نمی شود(LORENZEN and LAPATRA, 1999) .این آنتی بادی ها را می توان با استفاده از تکنیک های الیزا ، آنتی بادی درخشان غیرمستقیم ، خنثی سازی سرمی آنطوریکه بوسیله اولسن [۷۶]و همکاران (۱۹۹۱) ابداع شده است ،ردیابی کرد. در آن زمان آنها روش الیزا را به عنوان حساس ترین تکنیک گزارش کردند و از انواع مختلف آنتی بادی ها استفاده کردند. (آنتی بادی های وابسته به کمپلمان برای روش خنثی سازی سرمی و آنتی بادی های غیر وابسته به کمپلمان برای الیزا)(Olesen and Skall, 2011b).

اولسن و فری جندا – گرندز [۷۷](۲۰۰۷) روش های الیزا ، ۵۰٪ PNT و وسترن بلوتینگ [۷۸] را برای تعیین انتی بادی در یک جمعیت آنزئوتیک آلوده به ویروس VHS با استفاده از ۵۰ ماهی قزل آلا ارزیابی کردند . روش ۵۰٪PNT حساسیت بالاتری (۹۰٪) در مقایسه با ۴۱٪ از نمونه های مثبت در آزمون الیزا و ۶۱٪ برای آزمون وسترن بلات در هنگامی که برای ویروس سویه محلی آزمون انجام گردید ، نشان داده شد(Fregeneda-Grandes and Olesen, 2007).

نویسندگان نتیجه گیری کردند اختصاصیت متفاوت و متغیر آزمون الیزا باعث می شود که آزمون خنثی سازی سرمی به عنوان روش انتخابی برای غربالگری جمعیت های غیر آلوده به حساب آید. به علاوه نتایج مثبت کاذب دارای اثرات مخرب می باشد. مهم ترین نکته این است که انتخاب سویه ویروس بسیار ضروری است. آزمایشات سرمی نشان داد که واکنش خنثی سازی بر علیه جدایه های DK-F25 و F1 صورت نگرفت و ۹۰٪ واکنش ها بر علیه جدایه نوع ۳ بومی بود.

- **آزمایش فلورسانس آنتی بادی[۷۹]IFAT :**

آزمایش IFAT بوسیله وسترگراد – جورجنسن [۸۰] توسعه ابداع گردید و میلینگ [۸۱] (۱۹۷۲) آنتی ژن های ویروسی را در سلول های آلوده ویروس تا ۲۶ ساعت پس از عفونت تشخیص و ردیابی کرد.بالاترین میزان رنگ آمیزی ۱۸ تا ۲۸ ساعت پس از سنتز پروتئین ویروس و بازآرائی ویروس به دست آمد. رنگ آمیزی به خوبی هم از طریق واکنش متقاطع با مونو کلونال آنتی بادی و هم با آنتی بادی پلی کلونال به دست آمد.از آنتی بادی ثانویه متصل شده با فلورسین استفاده شد به طوری که آنتی بادی اولیه را مشخص کرده و سلول های عفونی را از طریق تولید رنگ آبی نشان می دهد. تکنیک رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس برای آنتی ژن

[75] Plaque neutralization test
[76] Olesen
[77] Fregeneda – Grandes
[78] Western Bloting (WB)
[79] Immunofluorescance Antibody technique
[80] Vestergard-Jorgensen
[81] Meyling

های ویروس و آنتی بادی ویروس در همان مقطع بافتی بوسیله وسترگراد – جورجنسن به وضوح و شفافیت اجرا شد. ردیابی آنتی بادی با استفاده از IFAT شامل سلول های فیکس شده بافتی حاوی آنتی ژن های ویروس متصل شده به آنتی بادی های سرم آزمایشی و سپس استفاده از یک آنتی بادی ضد گونه ای علامت گذاری شده با فلورسین اضافه می شود. اسلایدهای مثبت مناطقی از فلورسین مثبت را نشان می دهند که باید با نمونه های منفی و کنترل های مثبت مقایسه شود. (اولسن و اسکال ۲۰۱۱ ، OIE2016)

- (Elisa) الیزا[۸۲]

روش الیزا به طور گسترده ای برای تشخیص ویروس در سوپرنانت کشت مورد استفاده قرار می گیرد. اولین لایه در الیزا آنتی بادی های چسبیده به کف پلت می باشد که معمولا آنتی بادی پلی کلونال بر علیه VHSV است. اما به صورت آلترناتیو ممکن است از مونو کلونال آنتی بادی هم استفاده شود. مرحله دوم یک واکنش متوقف کننده است تا محل های مرحله جامد جذب نشده را بپوشاند که به طور طبیعی با آلبومین سرم گاوی یا پروتئین های شیر صورت می گیرد و مرحله سوم اضافه کردن ویروس است. مرحله چهارم اضافه کردن مونو کلونال آنتی بادی می باشد. به طور معمول آنتی بادی بر علیه پروتئین G و مرحله پنجم اضافه کردن یک آنتی بادی ضد گونه ای بر علیه مونو کلونال آنتی بادی است که با یک آنزیم الحاق می شود. (اولسن و اسکال ۲۰۱۱ ، OIE2016)

ماورتون [۸۳]و همکاران(1988) سه روش الیزا را برای ردیابی ویروس با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال متنوع بر علیه گلیکوپروتئین G ویروس گزارش کردندکه شامل :

۱- الیزای غیر مستقیم[۸۴]
۲- الیزای مستقیم[۸۵]
۳- الیزای به دام انداختن آنتی ژن[۸۶]

آنها نتیجه گیری کردند که حداقل غلظت پروتئینی مورد نیاز برای ردیابی ویروس 1ng/ml می باشد در جائیکه ۱/۵ fmol/ml از گلیکوپروتئین غشاء در مجموع پروتئینی حضور داشته باشد.

- تشخیص قطعی

تشخیص قطعی بیماری بر اساس ابتدا جداسازی ویروس از کشت سلولی و شناسایی آن با کمک میکروسکوپ الکترونی(به شکل گلوله) و سپس با استفاده از روشهای سرولوژیک و RT-PCR، توالی یابی ژنتیکی و رده بندی ژنوتیپی می باشد؛ البته، به دلیل بروز بیماریهایی با علائم مشابه توسط ویروسی از همان گروه مرفولوژیک در آزادماهیان، دیدن ویروس با میکروسکوپ الکترونیک، بتنهایی، تشخیص قطعی به دست نخواهد داد(.OIE,2016)

[82] Enzyme-Linked Immunosorbent assay
[83] Mourton
[84] Indirect Elisa
[85] Direct Elisa
[86] Antigen-Capture Elisa

معمولاً، نمونه برداری در پایشهای بیماری باید در دمای آب زیر ۱۴ درجه و یا وقتی که دمای آب، تقریباً، در پائینترین سطح آن در طی سال قرار دارد، از ماهیان قزل آلا یا سایر ماهیان حساس به بیماری که دچار ضعف و یا دارای رفتار غیر طبیعی بوده و یا تازه مرده اند و معمولاً به دلیل جریان آب، در قسمت خروجی آب استخرها جمع می شوند، صورت گیرد. انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، در جعبه های یونولیت پلی استیرن با دیواره ضخیم، در کنار آیس پک و حوله های کاغذی جاذب الرطوبه صورت گرفته که این نمونه ها در شرایط مناسب به طوری که یخ در کنار نمونه موجود باشد و دمای آن از ۱۰ درجه بالاتر نرود تا ۴۸ ساعت و در موارد استثناء تا ۷۲ ساعت برای انجام آزمایش ویروس شناسی قابل نگهداری است. در طی واگیری بیماری و همچنین بلافاصله پس از آن، می توان ویروس را بر روی کشت سلولی جداسازی نمود. (OIE,2016)

جدول۲-۲ روش‌های فعلی در دسترس برای مراقبت، تشخیص و تعیین ویروس VHS

روش	مراقبت هدفمند			تشخیص اولیه	تشخیص قطعی
	لارو	بچه ماهی	بالغین		
علایم ظاهری	D	D	d	B	D
آسیب شناسی بافتی	D	D	d	B	D
میکروسکوپ الکترونی	D	D	d	C	D
جداسازی در کشت سلول و متعاقب آن استفاده از روشهای شناسایی	A	A	a	A	A
روش های مبتنی بر پادتن	D	D	d	B	A
RT_PCRمعمولا همراه با تعیین توالی	C	C	c	B	A
Real time RT_PCR	C	C	c	A	A

روش‌های فعلی در دسترس برای مراقبت،تشخیص و تعیین ویروس VHS در جدول شماره ۴ لیست شده است. حرف های مورد استفاده در این جدول بیانگر :a=روش یک روش توصیه شده است بدلیل در دسترس بودن،استفاده و حساسیت و ویژگی آزمون b=روش یک روش استاندارد است با حساسیت و ویژگی خوب c=روش در بعضی موقعیت ها استفاده دارد اما قیمت، صحت یا عوامل دیگر استفاده از آنرا محدود می کند. d=روش در حال حاضر برای این هدف توصیه نمی شود.این توصیه ها چه بسا موضوعی هستند مثل مناسب بودن از نظر حساسیت، ویژگی و استفاده و واقع گرا .اگر آزمون ها ئی که تحت aیاb طبقه بندی شده اند مراتب اعتبار بخشی و استاندارد سازی طی نکرده باشند، نتایج آنها قابل استناد نمی باشد.(OIE,2016).