تشخیص احتمالی بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (Viral Haemorrhagic Septicaemia) VHS در تعدادی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلای ایران با روش هیستو پاتولوژیکی و آزمایش ملکولی(PCR)

دکتر عادل حقیقی خیابانیان اصل[۱] دکتر بهرام کاظمی[۲] دکتر مژگان بنده پور[۳]

چکیده:

با هدف و به منظور بررسی وضعیت آلودگی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان کشور (ایران) به ویروس عامل بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) از تعدادی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای کشور نمونه گیری بعمل آمد. نمونه های اخذ شده شامل بافت های کلیه، طحال، کبد، آبشش ، قلب، روده و پانکراس بوده که پس از کالبدگشایی ماهیان از بافت های هدف یاد شده برای هر دو روش آزمایشی (ملکولی) PCR و پاتولوژی نمونه برداری گردید که پس از مقایسه نتایج حاصله از مجموعه کل نمونه های ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه به روش PCR ۱۰ مورد مثبت و بقیه منفی بود و در روش پاتولوژی نیز از مجموع کل نمونه ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه تعداد ۱۵ مورد نمونه دارای علایم تیپیک پاتولوژیکی بوده و بقیه فاقد علایم پاتوگنومونیک تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه حاکی از پراکنش ویروس عامل بیماری VHS در برخی از مراکز تکثیر و مزارع پرورش قزل آلای کشور بوده و با توجه به نتایج مقایسه ای این بررسی لزوم سیاست گذاری نظارت بهداشتی و کنترل و پیشگیری بیماری اجتناب ناپذیر است.

در نهایت نتیجه اینکه ، با توجه به محاسن و اختصاصات ویژه هر کدام یک از روش های تشخیصی در این بررسی و مطالعه مقایسه ای این دو تکنیک تشخیصی در بیماری ویروسی (VHS) ایده بسیار مناسبی برای ادامهٔ مطالعات بر روی پاتوژنیسیتی (بیماریزایی) و جداسازی ویروس عامل بیماری و تعیین درجه حدّت آن برای اولین بار در ایران می باشد.

۱. گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران, -ایران

۲- دپارتمان انگل شناسي و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی -دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی – تهران،ایران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی -دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی – تهران،ایران

واژه های کلیدی: سپتی سمی هموراژیک ویروسی- پاتولوژی – (Nested-PCR) پی سی آر دو مرحله ای) - قزل آلای رنگین کمان- ایران

Probable Diagnosis of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in some rainbow trout propagation and breeding by histopathology and molecular techniques in Iran

Adel Haghighi Khiabanian asl[1], Bahram Kazemi[2] , Mojgan Bandehpour[3].

1. Department of Aquatic Disease , faculty of specialized Veterinary Sciences , Islamic Azad University of Iran, Science and Research Campus. Tehran, IR.Iran.
2. Parasitology Department, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract:

For consideration of the contamination of rainbow trout propagation and breeding centers in Iran to viral haemorrhagic septicemia (VHS), we prepared tissue samples from liver, kidney, spleen, bronchia, heart, intestine, and pancreas of rainbow trout with the symptoms of disease in these centers and considered the prepared samples by both molecular and pathological techniques. Comparison of results showed from all 100 establishment centers, 15 out of 100 examined samples with the pathology method and 10 out of 100 examined samples with the PCR are positive and the remains are negative with no pathognomonic signs. The obtained results shows that some rainbow trout hatcheries are contaminated in different regions of country, therefore, a definition of prevention, control program and eradication criteria is essential to protect the unaffected areas within the country. The results of this study revealed the high frequency of VHS virus in some centers of rainbow trout propagation and breeding in this country and therefore the control and diagnosis of disease is necessary . in result every methods that, suggested in this study is very useful for diagnostic tests and can be good idea for this virus isolation and consideration of the severity of its disorders for the first study in Iran .

Keywords: Viral haemorrhagic septicemia, Pathology, (Nested-PCR), Rainbow trout, Iran

مقدمه:

طبق مطالعات صورت گرفته این بیماری یکی از مشکلات عمده مزارع پرورش قزل آلا در اروپا می باشد(Castric, J., and P. de Kinkelin. 1980) در سال های اخیر مواردی مشکوک به این بیماری در مزارع پرورشی ایرن نیز مشاهده شده است.(Haghighi. et al., 2007)

بیماری VHS معمولاً فقط ماهیان پرواری را مبتلا می کند. (Post, G. 1989)و Roberts, R. J. and C. J. Shepherd 1974) و de Kinkelin, P. 1983)

قزل آلای رنگین کمان نسبت به این بیماری بسیار حساس است در حالی که قزل آلای قهوه ای نسبت به آن مقاومتر می باشد.اخیراً بیماری VHS در آزادماهیان پرورشی اقیانوس آرام و نیز در مزارع دریایی پرورش ماهی نیز گزارش شده است (Post, G. 1989,

ماهیان مبتلا عموماً بیش از ۵ سانتی متر طول دارند و مهمترین نشانهٔ آن تلفات سنگین است که معمولاً با خونریزی در پوست همراه می باشد. (Roberts, R. J. and C. J. Shepherd 1974، Naca, 1991)

ماهیان بسیار حساس به شدت تیره می شوند و به سرعت می میرند. آبشش این ماهیان رنگ پریده است و لکّه های خونریزی قرمزی را نشان می دهد. ممکن است در اطراف چشم نیز خونریزی هایی مشاهده می شود. در کالبدگشایی معمولاً لخته های بزرگ خون در چربی های بدن، روی غدد تناسلی و درون ماهیچه ها دیده می شود. کبد بسیار رنگ پریده و تا حدودی زرد رنگ می شود و کلیه نازک تر و به رنگ قرمز روشن درمی آید. پس از تلفات اولیه در یک همه گیری که نشان دهندهٔ حالت حاد بیماری است، بیماری به شکل مزمن درمی آید. در این حالت، تلفات کاهش می یابد و ماهی پس از گذشت مدت طولانی تری می میرد. (Shuzo, Eguza, 1991- Wolf, K. 1988 و Ahne, W., and I. Thomsen. 1985)

در این شکل، ماهی کاملاً تیره به نظر می رسد و بیرون زدگی چشم ها را نشان می دهد. این ماهیان به واسطه خونریزی شدید داخلی بسیار کم خون هستندکه این حالت بویژه در آبشش ها و کبد به خوبی مشخص است. کیسه شنا و کلیه ممکن است بزرگ شده یا تمام محوطه شکمی از مایعات پُر شود در این ماهی ها حالت ادم به خوبی مشاهده می گردد.

با پایان گرفتن همه گیری، نشانه های عصبی در ماهیان مبتلا آغاز می شود .(de Kinkelin, P., and J. Castric. 1982- Shuzo, Eguza, 1991) (فاز تأخیری)

ماهیان مبتلا پیچ و تاب می خورند و حرکات معلق وار دارند. وجود خونریزی در سرتاسر اندام های داخلی آزادماهیان همیشه زنگ خطری برای امکان وجود بیماری VHS می باشد. Post, G. 1989,) و Jorgensen, P. E. V. 1980)

شیوع بیماری زمانی رخ می دهد که درجهٔ حرارت آب در پایین ترین سطح خود قرار دارد (۱۴ تا ۴ سانتی گراد) اعتقاد بر این است که استفاده از ماهیان دریایی آلوده به بیماری در جیره های غذایی تر و تازه سبب انتقال بیماری می گردد، (Roberts, R. J. & C. J. Shepherd 1974) و این ماهیان نباید مورد استفاده قرار گیرند.

گاهی اوقات وجود بیماری در بچه ماهیان انگشت قد در تابستان گزارش شده است، ولی عفونت معمولاً در دمای بالاتر از ۸ درجه سانتی گراد حالت مخفی و نهفته دارد. در این حالت، وقتی دمای آب پایین بیفتد یا ماهیان تحت استرس ناشی از دستکاری قرار گیرند. بیماری دوباره همه گیر می شود. (Jorgensen, P. E. V. 1974a)

مواد و روش کار :

بهترین پایدارکننده بافتی فرمالین سالین ۱۰ ٪ می باشد. در مرحله آماده نمودن بافت ها ، قبل از قالب گیری بافتی احتیاج به آبگیری و سپس شفاف شدن دارد ، بطوریکه در یکسری الکل اتیلیک با درجات تزایدی از ۷۰ ٪ تا الکل مطلق انجام می گیرد و نمونه ها بایستی به اندازه ای باقی بمانند (حد اکثر دو ساعت) که برای اشباع شدن کامل لازم است و نگهداری طولانی مدت در الکل ها با درجه بالا سبب چروکیدگی و سختی بافت می شود و مراحل فوق توسط دستگاه اتوتکنیکون یا دستگاه گردش بافت انجام می گیرد و این دستگاه شامل بشرهای الکل اتیلیک و سبدهای فلزی می باشد. و قبل از شروع کار دستگاه، تنظیم زمان کار دستگاه توسط کاربر صورت می گیرد و معمولا بین ۲۰ تا ۲۴ ساعت نمونه ها در آن قرار داده می شود.(Roberts, R. J. 2001)

در مرحله اشباع بافتی به معنی اشباع شدن کامل بافت با ماده ای است که نمونه می بایست در آن قالب گیری شود و در عمل

خارج ساختن عامل شفاف کننده (گزیلل) و جایگزینی آن با پارافین می باشد. بهترین دمای پارافین بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد است. بعد از آماده شدن نمونه ها بهتر است بمدت ۲۴ ساعت در داخل یخچال نگهداری شوند و بعد برش بافتی با میکروتوم به اندازه ۵-۶ میکرون انجام شده و پس از قرار دادن در حمام گرم (بن ماری ۴۵ درجه) مقاطع بریده شده بر روی لام قرار داده می شود.روش استاندارد برای رنگ آمیزی لام ها ، روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین ، ائوزین می باشد. و در نهایت چسباندن لامل بر روی لام یا عمل مونته کردن توسط چسب کانادا بالزام صورت می گیرد.معمولا در پایان رنگ آمیزی هماتوکسیلین ، ائوزین هسته سلولها به رنگ آبی و سیتوپلاسم آنها به رنگ قرمز یا صورتی قابل مشاهده می باشد. (Roberts, R. J. 2001)

:Nested- PCR

از نمونه بافت مشکوک ارسال شده به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی شهید بهشتی استخراج DNA ویروس عامل بیماری VHS که از گروه ویروس تک رشته ای غیرسیگمانته خانواده رابدوویریده می باشد به روش فنل کلروفرم انجام شد.ابتدا واکنش RT-PCR با ۱µg ، 100u RNAآنزیم mMULV ، dNTP 0.1mM ، 10pmol پرایمر و 1X بافرRT-PCR در دمای ۴۲ درجه انجام و cDNA حاصل در واکنش nested-PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت ((Pherson Mc, Moller MJ (2000)).واکنش PCR در هر دو مرحله با 1X بافر PCR ، 0.1mM dNTP ، 1.5mM Mgcl2 ، ۱ µg DNA ، 20pmol پرایمر اختصاصی ژن و 1unit آنزیم Taq DNA polymerase در واکنش نهایی ۳۰ میکرولیتری انجام گرفت.برنامه PCR در ۳۰ سیکل با دمای annealing ۶۳ درجه در PCR اول و ۵۶ درجه در PCR دوم انجام گرفت. در نهایت پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در دستگاه ژل داکیومنتیشن ، حرکت باندهای DNA مربوط به آمپلی فای شدن ژن مورد نظر از ژنوم ویروس توسط دستگاه (Transiluminiotor u.v.) با طول موج ۳۲۰ نانومتر (nm) مشاهده و عکسبرداری گردید. (Kazemi B، ۲۰۰۴).

نمونه برداری :

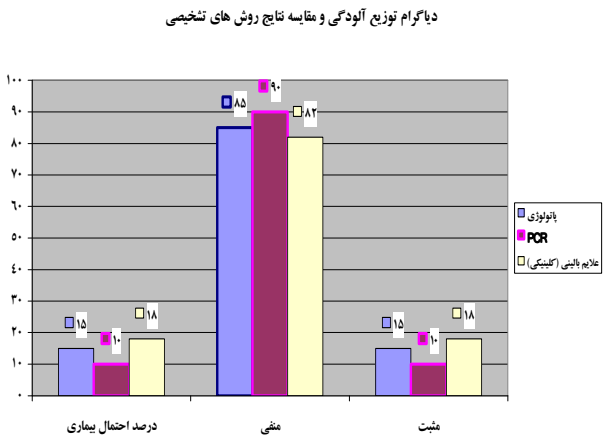
از پاییز سال ۸۳ لغایت پاییز سال ۸۵ از تعداد ۱۰۰ مزرعه پرورش ماهیان سردآبی واقع در ۱۰ استان مهم آبزی پرور کشور نسبت به اخذ نمونه های لازم برای هر دو روش آزمایش تشخیصی شامل ماهیان در حال تلفات (Moribund) و دارای علایم بالینی تیپیک و یا موارد تلفات موردی بدون علایم بالینی تیپیک اقدام گردید. برای نمونه های پاتولوژی از فیکساتیو فرمالین سالین ۱۰٪ و برای نمونه های PCR از فیکساتیو اتانول 20٪ استفاده گردید. نمونه های پاتولوژی طبق روش استاندارد هیستوتکنیک در پروسهٔ مقطع گیری قرار گرفته و با رنگ آمیزی (H&E) آماده سازی گردید و نمونه های اتانول 20٪ نیز حاوی بافت های هدف به آزمایشگاه بیوتکنولوژی (مولکولی) ارسال گردید.

عمده بافت های هدف مورد آزمایش قرار گرفته شامل کلیه قدامی، طحال، کبد، قلب، آبشش، روده و پانکراس و عضله می باشد. علایم هیستوپاتولوژیکی مهم شامل نکروز در اندام های خونساز مثل کلیه، نکروز و تخریب سلولی در پانکراس، خونریزی های شدید و عمقی در عضلات، بافت های سروزی کیسه شنا، قلب و کبد به همراه خونریزی های نقطه ای (پتشی) روی اندام های حفره شکمی و نیز هیپرتروفی کلیه و کیسه شنا و ادم شدید در این اندام ها می باشد (Roberts, R. J. 1989) از جمله علایم مهم کلینیکی و بالینی هم شامل تورم کلیه، خونریزی های شدید کبدی، اگزوفتالمی، پتشی سرتاسری، کم خونی آبشش ها، آماس خونی دهانی، ادم ناحیه شکمی (آسیت)، خونریزی های نقطه ای بر روی بافت چربی احشایی، خونریزی اطراف چشم ها، زخم های جلدی، تیرگی کلی رنگ بدن می باشد. (Roberts, R. J. 1989)

نتایج:

از تعداد ۱۰۰ مرکز تکثیر و پرورش ماهی با علایم بالینی و در حال تلف شدن نمونه ها از نظر پاتولوژی وآزمایشات مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. (جدول شماره ۱) با توجه به الکتروفورز محصول PCR روی آگاروز ۲٪ باند ۵۶۶ bp مربوط به ژن گلیکوپروتئین ویروس IHN می باشد(نگاره شماره ۱). همچنین در مطالعات بافت های پارانشیماتوز

بخصوص کلیه، توسط رنگ آمیزی با تکنیک ایمونوپراکسیداز اسی ، ویروس لوکالیزه شده در بافت هماتوپوئتیک کلیه مشخص می باشد (نگاره شماره ۲). و در مقطع هیستو پاتولوژیکی کلیه،نکروز شدید سلولی به همراه هسته های تکه تکه شده (کاریو رکتیک) مشاهده میگردد.(نگاره شماره ۴) .رنگ آمیزی (H&E).در بررسی های بالینی و کالبد گشائی نیز عمدتا علائم تیپیک خونریزی در کیسه شنا و چربیهای احشائی در اثر عفونت سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی قابل مشاهده می باشد.(نگاره شماره ۳)

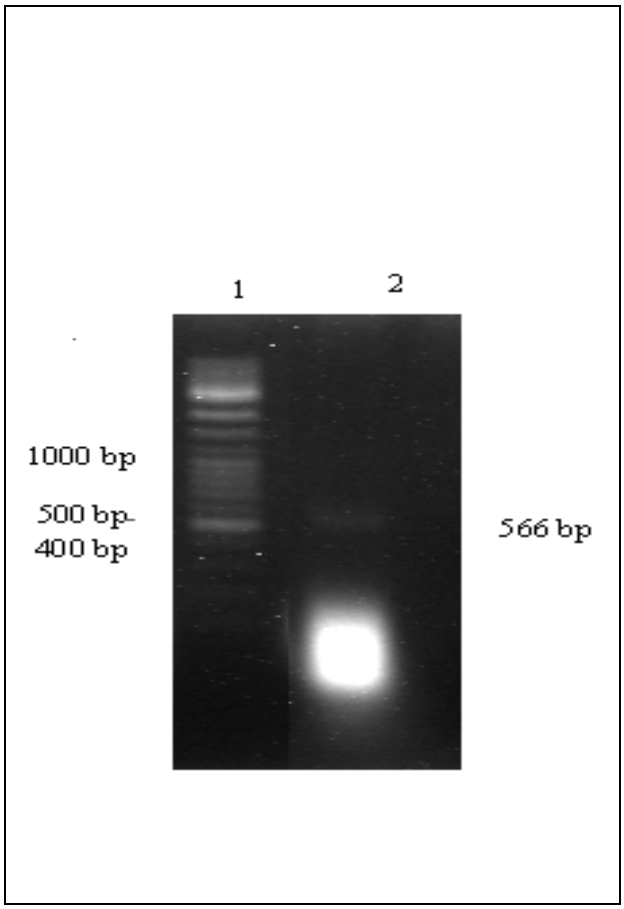


جدول شمار (۱): جدول نتایج نمونه ها و درصد آلودگی آنها:

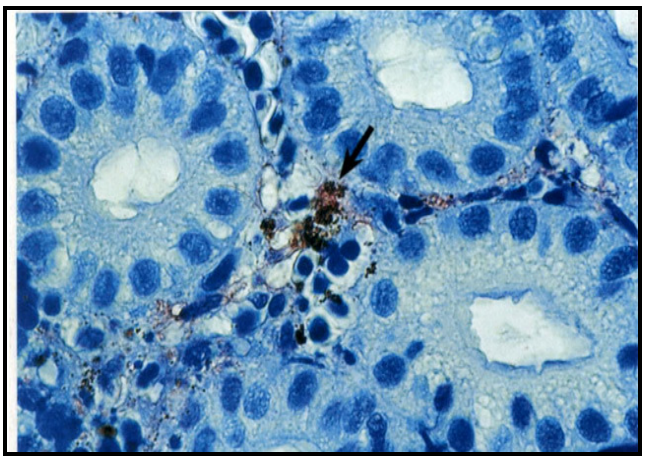
ردیف	استان	پاتولوژی			PCR		
		مراکز تحت بررسی	نمونه های دارای علایم	درصد نمونه های دارای علایم	مراکز تحت بررسی	نمونه های مثبت	درصد آلودگی در سطح مراکز
۱	مازندران	۲۵	۲	٪۸	۲۵	۱	٪۴
۲	گیلان	۹	۲	٪۲۲/۲	۹	۱	٪۱۱/۱
۳	اردبیل	۶	۳	٪۵۰	۶	۱	٪۱۶/۶
۴	لرستان	۸	–	٪۰	۸	–	٪۰
۵	مرکزی	۴	۲	٪۵۰	۴	۲	٪۵۰
۶	خراسان شمالی	۶	۲	٪۳۳/۳	۶	۲	٪۳۳/۳
۷	کردستان	۱۰	۳	٪۳۰	۱۰	۳	٪۳۰
۸	کهگیلویه و بویراحمد	۱۲	۱	٪۸/۳	۱۲	–	٪ ۰
۹	آذربایجان غربی	۸	–	٪۰	۸	–	٪۰
۱۰	اصفهان	۱۲	–	٪۰	۱۲	–	٪۰
میانگین درصد موارد مثبت		۱۰۰	۱۵	۲۰/۱۸	۱۰۰	۱۰	۱۴/۵

جدول شماره (۲): جدول نتایج مثبت و منفی ۱۰۰ مرکز بررسی شده در کشور:

درصد احتمال بیماری	منفی	مثبت	نتایج
۱۵	۸۵	۱۵	پاتولوژی
۱۰	۹۰	۱۰	PCR
۱۸	۸۲	۱۸	علایم بالینی (کلینیکی)

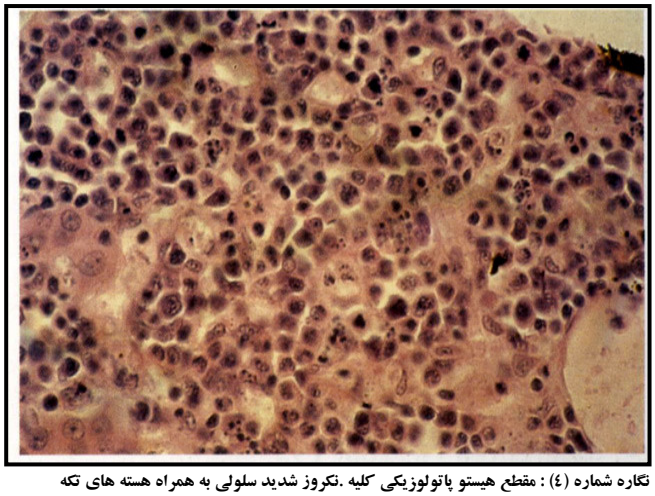


نگاره شماره (۱): الکتروفورز محصول PCR روی آگاروز ۲٪
ستون ۲ محصول PCR مربوط به ژن گلیکوپروتئین ویروس را نشان میدهد.



نگاره شماره (۲): مقطع هیستوپاتولوژیکی کلیه، رنگ آمیزی توسط تکنیک ایمونوپراکسیداز اسی که نشان دهنده ویروس لوکالیزه شده در بافت هماتوپوئتیک کلیه است.(فلش)

نگاره شماره (۳):کالبد گشائی ماهی الوده با علائم تیپیک خونریزی در کیسه شنا و چربیهای احشائی در اثر بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی.



نگاره شماره (٤) : مقطع هیستو پاتولوزیکی کلیه .نکروز شدید سلولی به همراه هسته های تکه تکه شده (کاریو رکتیک).رنگ آمیزی (H&E)

بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آلودگی و احتمالاً بروز بیماری VHS در برخی از مزارع پرورش قزل آلای ایران می باشد. از تعداد کل نمونه های ۱۰۰ مرکز بررسی شده به روش تشخیص پاتولوژیکی، تعداد ۱۵ مورد دارای علایم تیپیک تشخیصی بوده و با روش Nested-PCR با متد طراحی پرایمر اختصاصی بیماری VHS ، تعداد ۱۰ مورد مثبت بدست آمد.

با توجه به مقایسه نتایج مثبت هر دو مطالعه انجام گرفته علاوه بر این که تأیید تشخیصی بصورت مقایسه ای نسبت به همدیگر می باشند، نقطهٔ قوتی در امر تشخیص نهایی نیز می باشد. البته در کنار روش تشخیص پاتولوژیکی روش دقیق و حساس تری همچون PCR می تواند بسیار ارزشمند باشد و نیز یافته های بالینی با پیش بینی بروز تلفات قابل توجه در برخی از مزارع پرورشی نمونه برداری شده در درجه حرارت های پایین تر را تقویت می کند. برای رسیدن به این اهداف ابداع روشهای اختصاصی و حساس برای تشخیص بیماری مانند PCR از اهمیت ویژه ای برخوردار است (OIE, 2006)

با توجه به اینکه روش های تشخیصی نظیر الایزا (OIE, 2006) و ایمونوهیستوشیمی (Haghighi. et al, 2007) و فلورسنت آنتی بادی درخشان (OIE, 2006) برای بیماری (VHS) کاربرد دارد ولی به لحاظ بروز واکنش های متقاطع بین ویروس های دیگر (OIE, 2006) با عامل مولد بیماری VHS، احتمال بروز خطا در تفسیر این آزمایش ها وجود دارد، لذا یک روش تشخیص حساس و مطمئن تر مثل PCR ، جهت مقایسهٔ نتایج روش ها مورد نیاز است (OIE, 2006) و ایجاد آزمایشگاه ویروس شناسی جهت مطالعه بیماریزایی و جداسازی ویروس عامل مولد جهت تأیید قطعی بیماری الزامی است تا اولاً ویروس عامل بیماری جداسازی گردیده و ثانیاً درجه حدت آن مطالعه شود. (OIE, 2006) البته مشخص نمودن مقدار و حدت این آنتی ژن ویروسی (پاتوژن) به عوامل عمده ای مثل طول دوره کمون بیماری، مقدار مقاومت ایمنی بدن ماهی، عوامل جانبی استرس زا و عوامل محیطی در ارتباط با فصل، دما، تغییرات pH و نوسانات استرسی وابسته می باشد (OIE, 2006) رعایت دقیق ضوابط بهداشتی و کنترلی بیماری در مراکز تکثیر و پرورش و نیز با اعمال مدیریت های قرنطینه ای و ایزوله سازی ماهی های ناسالم و یا دارای رفتارهای غیرعادی از نوع سالم در جلوگیری از شکل گرفتن کانون حاد و شدید بیماری نقش بسزایی دارد. البته یکی از دلایل عمده ای که می تواند عدم بروز بیماری و تظاهرات بالینی در این مراکز را توجیه

نماید، کم حدت بودن سویه ویروسی آلوده کننده نیز می باشد. (Haghighi. et al, 2007)

با روش PCR ژنوم ویروس عامل بیماری شناسایی می شود و در صورتی که ویروس در مراحل اولیه تکثیر باشد و یا حتی اگر در اثر ضایعه سلولی، تخریب سلولی نیز صورت گرفته باشد، امکان شناسایی ان وجود دارد

البته این امکان نیز وجود دارد که ویروس های باقی مانده، سلول های سالم برای تکثیر در اختیار نداشته باشند و در اثر آنزیم های موجود تخریب شوند و ژنوم آن نیز توسط آنزیم های RNase و DNase موجود در محیط از بین رفته و در تست PCR قابل شناسایی نباشد.(Haghighi. et al, 2007)

نتیجه گیری :

بطور کلی نتایج بدست آمده در هر دو روش PCR و تشخیص پاتولوژیکی قابل همخوانی می باشند و از تعداد ۱۰۰ نمونه مراکز مورد بررسی ، تعداد ۱۸ مورد از آنها علایم کلینیکی منتسب به VHS داشته و تعداد ۱۵ مورد نمونه مثبت با تشخیص علایم پاتولوژیکی و تعداد ۱۰ مورد نمونه مثبت به روش PCR تشخیص داده شده است.

بطور کلی در مزارع پرورش ماهیان قزل الا ی ایران احتمال وجود بیماری ویروسی سپتی سمی خونریزی دهنده وجودداشته و دو روش PCR و پاتولوژی برای تشخیص بیماری مفید بوده و با یکدیگر همخوانی دارند.

منابع:

-Haghighi A, Soltani M , Kazemi B, Sohrabi I and Sharifpour I, (2007). Use of Immunohistochemical and PCR Methods in Diagnosis of Infection Haematopoietic Necrosis Disease in some Rainbow Trout Hatcheries in Iran.pakistan journal biological science .ISSN 1028-8880 : 10(2): 2007p.p 230- 234, (WWW.PJBS.org).

-Wolf, K. (1988) Fish viruses and fish viral Disease. Cornell university press, Ithaca, New York.

-Roberts, R. J. (2001) Fish pathology. Bailliere Tindall, London.238-243 P.P and 386-387 p.p

-Naca. (1991): Fish health management in Asia-Pacific Report on a Regional study and workshop on fish disease and fish health management ADB Agriculture Department Report series No. 1 June 1991 Bangkok, Thailand 627 pp. 340-355 P.P

-Roberts, R. J. and C. J. Shepherd 1974: Handbook of Trout and salmon Disease the white friars press Ltd, London and Cambridge. 168 pp.

-Post, G. (1989) Textbook of fish health. T. F. H. publication Inc. 293 pp.

-Shuzo, Eguza., (1991): Infectious disease of fish Japonese Transl. of sa kana no kansensho., oxonian press pvt, Ltd., New Delhi 696 pp.

-Kazemi B, Bandehpour M, Yahyazadeh H. Roozbehi M , Seyed N, Ghotasloo A , and Taherpour A (2004). Comparative study on HCV detection in Iranian patients by RT– PCR and ELISA techniques during 2001-2003. J. Med. Sci. 4(2); 132- 135.

-Pherson Mc, Moller MJ (2000). PCR. The Basics from Background to Bench. Bios Scientific publishers. Chapter 2; Undrestanding PCR.,pp: 9-21.

-OIE/ office International de Epizooties (2006). International aquatic animal Health Code. Fish, Mollusce and crustaceans. Fifth edition, 469 pp. notifiable disease chapter 2.1.5. pp .141-158

-Jorgensen, P. E. V. 1974a. A study of viral diseases in Danish rainbow trout, their diagnosis and control. Commissioned by A/S Carl Fr. Mortensen, Bulowsvej 5 C 1870 Kobenhavn V, Denmark, 101 pp.

-Jorgensen, P. E. V. 1980. Egtved virus: the susceptibility of brown trout and rainbow trout to eight virus isolates and the significance of the findings for the VHS control. Pages 37 *in* W. Ahne, ed. Fish diseases. Third COPRAQSession. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York.

-de Kinkelin, P., and J. Castric. 1982. An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry, *Salmo salar* L., to viral haemorrhagic septicaemia. J. Fish Dis. 5:5765.

-Castric, J., and P. de Kinkelin. 1980. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson reared in seawater. J. Fish Dis. 3:2127.

-Ahne, W., and I. Thomsen. 1985. Occurrence of viral hemorrhagic septicemia virus in wild whitefish *Coregonus* sp. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B 32:7375.

-de Kinkelin, P. 1983. Viral haemorrhagic septicaemia. Pages 5162 *in* D. P. Anderson, M. Dorson, and Ph. Dubourget, eds. Antigens of fish pathogens. Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.