

از جمله خواص ویروسی:

- ۱- این ویروس به حرارت، اسید و اتر و اشعه U.V و یدوفورها و pH کمتر از ۴ و بالاتر از ۱۰ حساس است.
- ۲- رشد و تکثیر در محیط های تیره های سلولی RTG-2/ -FHM- EPC- CHSE214 در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  -  $4^{\circ}\text{C}$  (دمای مطلوب  $15^{\circ}\text{C}$ ) انجام می گیرد.
- ۳- لیوفیلیزاسیون ویروس در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم و نگهداری آن در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  باعث حفظ حدت ویروس تا چندین سال می گردد.
- ۴- میزان pH مناسب برای نگهداری ویروس ۸-۶ است.
- ۵- اندام های آلوده به ویروس را یک ماه در  $20^{\circ}\text{C}$  می توان نگهداری نمود و نگهداری طولانی مدت تا یک سال موجب از دست دادن حدت ویروس می شود.

#### علائم بالینی بیماری:

- ۱- مرگ و میر بیش از حالت عادی در بچه ماهیها تا انگشت قدها.
- ۲- نوزادان مبتلا دچار بی حالی شده و در اطراف و حاشیه های استخر شنا می کنند.
- ۳- ماهیان مبتلا دارای شنای همراه با چرخش به پهلو بوده و گاهی حالت چرخش روی پهلو یا (Flashing) نیز دیده می شود.
- ۴- آگزوفتالمی یک علامت متداول می باشد.
- ۵- ماهیان مبتلا رنگ تیره تر از حالت طبیعی دارند.
- ۶- آبشش ها کمرنگ، خونریزی در باله ها و پیدایش رنگ قرمز تیره در ناحیه سر.
- ۷- پیدایش زخم های بزرگ پوستی در ناحیه خلفی و تا حدی باله های شکمی.

## بررسی بیماری نکروز عفونی مراکز خونساز در برخی از مزارع تکثیر و پرورش قزل آلاهی رنگین کمان کشور به روش غیرمستقیم آنتی بادی

### درخشان Indirect-FAT

دکتر مهدی سلطانی<sup>۱</sup>، دکتر عادل حقیقی خیابانیاصل<sup>۲</sup>، دکتر مجید رجبی<sup>۳</sup>

#### مقدمه:

بیماری نکروز عفونی بافت های خونساز یک بیماری سیستمیک و حاد در آزاد ماهیان می باشد که در اواخر دهه ۱۹۵۰ در چندین مورد شیوع باعث ایجاد خساراتی در مزارع پرورش آزاد ماهیان در شمال امریکا شد. در سال ۱۹۶۸ از طریق انتقال ماهی آزاد نقره ای از کشور امریکا به ژاپن این بیماری منتقل شد و ابتدا تصور می شد که این ماهی تنها گونه حساس می باشد ولی بعدها مشخص شد که علاوه بر آن گونه هایی نظیر ماهی آزاد سیاه (چینوک)، قزل آلاهی رنگین کمان، قزل آلاهی حلق بریده به ویروس عامل (IHN) حساس هستند. اسامی مترادف برای این بیماری انتخاب شده است که همگی متداول و قابل قبول می باشند از جمله: بیماری کولمن- بیماری ماهی آزاد قرمز رود خانه کلمبیا- بیماری ویروسی دریاچه کالتوس- بیماری ماهی آزاد سیاه رود خانه ساکرا منتو- بیماری ویروسی ماهی آزاد قرمز- بیماری ماهی آزاد ارگون.

#### عامل مولد

عامل مولد (IHND) یا Infectious Haematopoietic Necrosis Disease یک ویروس RNA دار یک رشته ای از رابدوویروس ها با ابعاد ویروس (۷۵ - ۶۵ \* ۱۹۰ - ۱۵۰) می باشد.

۱- دکتر مهدی سلطانی - دانشیار گروه بهداشت و بیماریهای آبریان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۲- دکتر عادل حقیقی خیابانیاصل- استادیار گروه پاتولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۳- دکتر مجید رجبی- کارشناس ارشد دفتر بهداشت و مبارزه با بیماریهای آبریان سازمان دامپزشکی کشور

- ۸- مشاهده تغییرات اسکلتی شامل لوردوزیس و اسکولیوزیس.
- ۷- مشاهده کست های مدفوعی ناشی از کنده شدن مخاط گوارشی.
- ۹- مشاهده پتشی روی اندام های داخلی به همراه کمرنگی محسوس این اندام ها.
- ۸- مشاهده دژنرسانس هیالینی از نوع قطره ای در اپی تلیال توبولی کلیه.
- ۱۰- وجود مایع موکوسی زرد رنگ و قدری کد در روده و معده.
- ۹- چاق شدن به همراه هیپرپلازی اپی تلیال آبشش ها. (غیراختصاصی)
- ۱۱- تجمع مایع آسیت در محوطه شکمی.
- ۱۰- لکوپنی به همراه دژنره شدن لکوسیتها و ترومبوسیتها و پیدایش ذرات سلولی زیاد در خون.
- ۱۲- مشاهده نقاط پتشی در چربی احشاء مزانتر، صفاق، کیسه شنا و منتر و پریکارد.

### تشخیص:

- آسیب شناسی بیماری:
- ۱- تغییرات دژنراتیو و نکروز کانونی در کلیه ها، طحال، کبد، پانکراس و سلول های گرانولار مخاط دستگاه گوارش در اثر تکثیر و تراید ویروس در سلول های آندوتلیال و سلول های مربوط به بافت های خونساز ماهی.
- ۱- مشاهده علایم تیپیک از قبیل تیره شدن بدن، اگزوفتالمی و تورم شکم در نوزادان و بچه ماهیان قد انگشت.
- ۲- افزایش تعداد سلول های ماکروفاژ در قسمت قدامی کلیه.
- ۳- مشاهده نواحی کانونی پیکنوزه، هسته های چند شکلی و حاشیه ای شدن کروماتین.
- ۴- نکروز پیشرفته در بافت بینابینی کلیه (کورتکس و آدرنال).
- ۳- مطالعه هیستوپاتولوژی و مشاهده یافته های نکروز بافت های کلیوی و کبدی و بویژه دژنرسانس سلول های گرانولار مخاط روده (استراتوم کمپکتوم و استراتوم گرانولوزوم)
- ۴- تهیه گسترش از قسمت قدامی کلیه و رنگ آمیزی گیسما و مشاهده اجرام نکروبیوتیک سلولی. (غیراختصاصی)
- ۵- مشاهده گلبول های قرمز نابالغ، چند شکلی و دارای سیتوپلاسم واکونله.
- ۶- تشخیص قطعی از طریق جداسازی و شناسایی سرولوژیکی ویروس در روی تیره های سلولی، مخصوصاً RTG-2/ CHSE214/FHM/ EPC/BF-2
- ۵- دژنرسانس و نکروز سلول های گرانولار نوزینوفیلی واقع در استراتوم کمپکتوم و استراتوم گرانولوزوم دستگاه گوارش. (تفکیک بیماری IHN با VHS)
- ۶- مشاهده نواحی دژنرسانس و نکروز شدید به همراه سروئید در بافت کبدی.

### انتقال:

- ۱- انتقال به روش مستقیم و از طریق آبشش ها، آب، تجهیزات و لوزام کارگاه و خوراکی و راه تزریقی صورت می پذیرد. (انتقال افقی)
- ۲- انتقال از طریق راه عمودی و بصورت مادرزادی انجام می گردد.
- ۳- ویروس از طریق مدفوع، ادرار، مایعات جنسی و ترشحات موکوس پوست دفع می شود.
- ۴- بیشترین محل لوکالیزه شدن ویروس در کلیه ها، طحال و دستگاه گوارش می باشد.
- ۵- ماهیان مولد و آلوده به ویروس (حاملین بهبود یافته) منبع مهم انتقال بیماری می باشند.
- ۶- ویروس می تواند در مایعات تخمدانی وجود داشته باشد ولی تخم ها در نهایت بصورت سطحی به ویروس آلوده می شوند و ویروس در عرض ۳ ساعت بعد از لقاح جدا می شود ولی بعد از ۲۴ ساعت بعد از لقاح جداسازی آن مشکل است.
- ۳- نگهداری جداگانه نوزادان و انگشت قدها از مولدین.
- ۴- ضدعفونی تجهیزات و ابزار کارگاه و تهیه تخم از مولدین عاری از بیماری.
- ۵- ضدعفونی آب های سطحی و استفاده از آبهای زیرزمینی (چاه و چشمه)
- ۶- واکسیناسیون ماهیان علیه بیماری راه مطلوب است ولی واکسن های تجاری در حد تجربه و آزمایش می باشند. واکسن های DNA امروزی نیز گران قیمت است.
- ۷- استفاده از ترکیبات نوکلئوزیدهای آنالوگی ضد ویروسی از جمله: ۶- تیوانینوزین (Thioinosine 6-) به تعداد ۰/۱ میلی گرم برای هر میلی لیتر، ۵- هیدروکسی یوریدین (hydroxyuridine 5-) به مقدار ۱۰ میکروگرم برای هر میلی لیتر

### تاریخچه وضعیت بیماری در ایران:

طبق گزارش های موجود اولین وقوع بیماری مشکوک به IHN بصورت یک اپیدمی تلفات گیر از سال ۱۳۷۸ لغایت ۱۳۷۹ در استان فارس رخ داده است که دکتر اخلاقی و همکاران اقدام به آزمایشات تشخیصی مربوطه کرده و موارد مثبت سرولوژیک IHN جدا سازی و گزارش شده است. پس از آن طی سالهای ۱۳۸۲-۱۳۷۹ آقای دکتر سلطانی و همکاران مطالعاتی در خصوص بررسی حضور ویروس IHN در مناطقی از کشور نموده در اوایل سال ۱۳۸۱ موفق به جداسازی و شناسایی نوعی ویروس مشابه IHN از برخی مولدین شدند که نتایج حاصله در قالب پایان نامه تخصصی و مقالات مربوطه و نیز گزارش دکتر فلاحی منتشر شده است. بدنبال جداسازی و شناسایی ویروس و نیز مطالعات جنبی دیگر و نیز با توجه به تلفات قابل توجه که هر ساله در برخی مراکز تکثیر به وقوع می پیوندد، دفتر بهداشت آبزیان اقدام به بررسی و نمونه برداری از برخی از

### کنترل:

- ۱- اساس کنترل بیماری بر پیشگیری و پرهیز از بیماری می باشد (مقررات قرنطینه ای و ریشه کنی و اعمال شرایط بهداشتی)
- ۲- ضدعفونی تخم ها با استفاده از یدین ppm ۱۰۰ در pH = ۶ به مدت ۱۰ دقیقه مناسب است.

مراکز تکثیر دارای تلفات بالا نمود و مطالعه حاضر نتیجه بررسی های انجام گرفته می باشد.

### روش کار:

در این بررسی از آزمایش آنتی بادی های درخشان به روش غیرمستقیم استفاده شده است.

این آزمایش توسط OIE برای تشخیص سریع و موارد بررسیها در مناطقی که بیماری وجود دارد توصیه شده است.

مراحل انجام آزمایش به طور خلاصه شامل:

- ۱- تهیه گسترش از بافت های ماهیان مبتلا
- ۲- فیکس کردن گسترش با استن سرد
- ۳- افزودن آنتی بادی ضد ویروسی و انکوباسیون
- ۴- شستشو در بافر مربوطه (بافر حاوی توین)
- ۵- افزودن کونژوگه مربوطه (FITC) و انکوباسیون
- ۶- شستشو با بافر مربوطه
- ۷- مونته کردن لامها با بافر گلیسرول نمکی
- ۸- مشاهده لامها در زیر میکروسکوپ u.v
- ۹- استفاده از نمونه های کنترل منفی و کنترل مثبت

۱۰- با این آزمایش اقدام به نمونه گیری تصادفی از مجموعه تعدادی لارو بچه ماهی متعلق به ۱۴ استان دارای تلفات شدید در سطح کشور اقدام شد.

آنتی بادی ضد ویروس (IHNV) در PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲ که حاوی مقدار ۰/۰۵ درصد تووین ۸۰ (PBST) است استفاده می گردد. سلول های تک لایه خشک شده را

جهت آگیری ۴ بار با محلول (PBST) شسته تا بافر کاملاً حذف شود این سلول های تک لایه در حضور آنتی بادی به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در گرمخانه گذاشته می شود و بعد ۴ بار شستشوی مجدد داده می شود در ادامه سلول های هدف را در حضور آنتی بادی کونژوگه با محلول فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه می شود و بعد از ۴ بار شستشوی مجدد با (PBST) سلول های تک لایه نشاندار شده در مجاورت محلول نمکی گلیسرول با pH = ۸/۵ را بصورت اسلاید میکروسکوپی تهیه می کنند و به توسط میکروسکوپ u.v فلورسنت دار نتایج را بصورت Plus<sup>+</sup> تا plus<sup>4+</sup> در مقایسه با کنترل مثبت و منفی اعلام می نمایند.

### نتایج بررسی:

در تحقیق صورت گرفته از استانهایی که در سطح کشور دارای عمده تلفات سنگین بوده اند آمار زیر حاصل آمده است:

- ۱- استان مرکزی (اراک- ساوه) تلفات ۵۰٪  
تعداد ۱۱۷۵۰۰۰ قطعه
- ۲- استان چهارمحال و بختیاری (شهرکرد- لردگان- ناغان- نصیرآباد) تلفات ۹۰-۵۰٪ تعداد ۴۸۳۸۰۰۰ قطعه
- ۳- استان خراسان (مشهد) تلفات ۷۰٪ تعداد ۲۱۰۰۰۰۰ قطعه
- ۴- استان اصفهان (تکاب زاینده رود) تلفات ۷۰٪  
تعداد ۱۵۵۰۰۰۰ قطعه
- ۵- استان تهران (فیروزکوه) تلفات ۹۵٪ تعداد ۷۰۰۰۰۰ قطعه
- ۶- استان اردبیل (مشگین شهر) تلفات ۲۰٪  
تعداد ۴۸۰۰ قطعه ۱۰۳۶۷۸۰۰

موارد آلوده مثبت شناخته شده با این آزمایش :

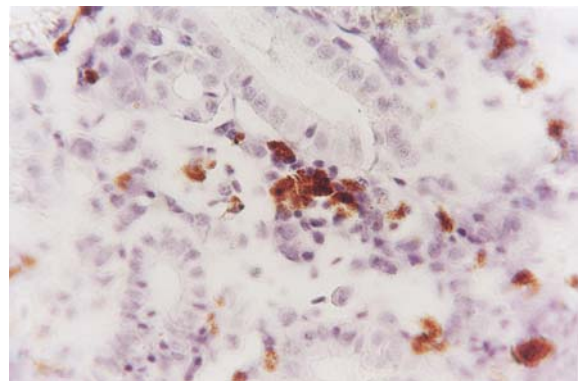
۱- استان قزوین	۱ مورد
۲- استان مازندران	۲ مورد
۳- استان اردبیل	۲ مورد
۴- استان آذربایجان غربی	۱۴ مورد
جمع کل تعداد موارد مثبت (+)	۱۹ مورد

همکاران) و نیز این مطالعه حکایت از آلودگی برخی مزارع تکثیر به نوعی ویروس مشابه IHN دارد ولی از آنجائیکه پاتوژنیستی این ویروس کار نشده است نمی توان با قطعیت هر تلفات اتفاق افتاده را به این بیماری نسبت داد. بهر حال با توجه به نتایج جداسازی ویروس و مطالعات سرولوژی تاکنون انجام شده در کشور، ضرورت تداوم این گونه مطالعات به منظور ۱- جداسازی مجدد ویروس ۲- بررسی حدت آن ۳- مطالعات سرولوژی برای تعیین میزان آلودگی مزارع تکثیر و ۴- نهایتاً اعمال مقررات ریشه کنی و قرنطینه ای ضروری است.

#### منابع :

- سلطانی، مهدی (۱۳۸۰)، بیماریهای آزاد ماهیان-بخش بیماریهای ویروسی. انتشارات دانشگاه تهران
- سلطانی و همکاران (۲۰۰۲)، جدا سازی و شناسایی ویروس عامل IHN از برخی مزارع تکثیر قزل آلاهی کشور (آرشیو رازی)
- حقیقی، عادل. ۱۳۸۴. اصول نمونه برداری در آبزیان (بخش ماهی)، ترجمه و گردآوری، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور، دفتر بهداشت و مبارزه با بیماری های آبزیان،
- فلاحی، روزبه (۲۰۰۲)-مطالعه جداسازی و شناسایی رابدوویروس عامل بیماری نکروز مراکز خونساز در برخی کارگاههای قزل آلاهی رنگین کمان کشور - پایان نامه دکترای تخصصی (Ph.D) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران- شماره پایان نامه ۱۶۶، سال تحصیلی ۸۳-۸۲
- بهتر، حمید رضا- بررسی عفونت های رابدوویروس در ماهیان - پایان نامه دکترای عمومی (D.VM). دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کرج. شماره پایان نامه ۳۱۷، سال تحصیلی ۷۸-۱۳۷۷
- Amend, D. F. (1970a). Approved procedure for determining absence of infectious haematopoietic necrosis (IHN) in salmonid fishes. U.S. Fish wild. Sevv. Fish Dis. Leaflet 31.

قابل توجه می باشد که بقیه استانهای دارای تلفات سنگین در تشخیص آزمایشگاهی به روش (Indirect FAT) گزارش منفی (-) داشته اند.



نگاره شماره 1: مقطع هیستوپاتولوژیک بافت کلیه -رنگ آمیزی به روش غیر مستقیم آنتی بادی درخشان، سلول های مراکز خونساز کلیه.(بزرگنمایی ۱۰۰×۵)

#### نتیجه گیری :

بروز بیماری IHN وابسته به فاکتورهایی مثل :

سن، مراحل رشد، نوسانات درجه حرارت آب محیط پرورش می باشد. بدین ترتیب که با افزایش سن و نزدیک شدن به فصول گرم سال از تصاویر گزارشات مبنی بر تلفات ناشی از (IHN) کاسته می شود اما ماهیان موجود (حاملین) بصورت ناقلین و مخازن نگهداری ویروس عمل می نمایند. نتیجه مطالعات همکاران قبلی (دکتر اخلاقی، دکتر سلطانی و

- OIE (2006) Diagnostic Manual for Aquatic animal disease office International des Epizootics, paris

Roberts, R. J. (2001) fish pathology. Bailliere p.p Tindall, London 233-238