بررسی بیماری نکروز عفونی مراکز خونساز (IHN) به روش ایمونوهیستوشیمی در برخی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلای کشور

دکتر عادل حقیقی خیابانیان اصل [۱] .دکتر مهدی سلطانی [۲] .دکتر ایرج سهرابی حقدوست [۳] .دکتر عیسی شریف پور [۴]

چکیده

به منظور بررسی وضعیت آلودگی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان کشور به ویروس عامل نکروز عفونی بافتهای خونساز از تعدادی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای کشور در مرحله لاروی و از بچه ماهیان انگشت قد ی که دارای علایم تحت کلینیکی و یا بظاهر سالم بودند نمونه گیری بعمل آمد. نمونه های اخذ شده شامل بافتهای کلیه .طحال.کبد.آبشش.قلب و دستگاه گوارش بوده که پس از پروسس هیستو تکنیک به روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد ویروس عامل نکروز عفونی بافتهای خونساز و نیز با استفاده از رنگ هماتوکسیلین رنگ آمیزی گردید.نتایج حاصله نشان داد از مجموع کل نمونه های ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه تعداد ۳۵ مورد مثبت بود که حاکی از پراکنش ویروس عامل بیماری IHN در برخی از مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای کشور می باشد. با توجه به نتایج این بررسی لزوم طراحی سیاست های بهداشتی، نظارت ، هدایت کنترل عملیات پیشگیری اجتناب نا پذیر می باشد.

واژه های کلیدی: نکروز بافتهای خونساز-آنتی بادی منوکلونال- ایمونوهیستوشیمی- قزل آلای رنگین کمان-ایران

Abstract

Study of infectious haematopoietic necrosis disease in some rain bow trout hatcheries in iran using Immunohistochemical technique

Haghighi.A[1] Soltani.M[2] Sohrabi Haghdoost.I[3] Sharifpoor.E [4]

To detect rain bow trout (oncorhynchus Mykiss) hatcheries localed in various provinces of Iran for infectious haematopoietic necrosis virus, overall larvae and fingerling sampled and kidney, spleen, liver, gills, Heart and intestine were recovered. Tissue samples were processed using standard histotechnique and then stained using immunohistochemical procedure as a results, 35 out of 100 examined samples with either a sub clinical (unrecognized) or apparently healthy (Asymptomatic) were positive for IHNV by immunohistochemical Test. 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.

Keywords: infectious Haematopoietic necrosis, Monoclonal Antibody, Immunohistochemical, Rainbow trout ، iran

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

۲- گروه بهداشت وبیماریهای آبزیان- دانشکده دامپزشکی تهران-ایران

۳- گروه پاتولوژی-دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی –دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات- تهران-ایران

۴- گروه پژوهشی موسسه تحقیقات شیلات-تهران-ایران

مقدمه:

از بین ویروس های بیماریزا در ماهی خانواده رابدوویروس ها از اهمیت بیشتری برخوردار بوده بطوریکه تعداد قابل توجهی از بیماریهای ویروسی و حاد ماهیان در این بخش قرار می گیرند که از آن جمله بیماری نکروز مراکز خونسازاز نظر اقتصادی توجه بیشتری را می طلبد.این بیماری از نظر اپیدمیولوژیک به هر دو روش افقی و عمودی قابل انتقال بوده ومیزبان خود را در همه محیط های آبی مبتلا می نماید. تلفات لاروها در دمای زیر ۱۵ درجه سانتی گراد به حداکثر می رسد.در کشور ایران نتایج مطالعات وتحقیقات انجام شده تاکنون منجر به جدا سازی ویروس از برخی مولدین قزل آلا گردیده است(سلطانی و همکاران ۲۰۰۲).که حاکی از آلودگی مولدین در برخی از مزارع کشور می باشد.با توجه به جدا سازی ویروس و ردیابی سرولوژیک آن بکار گیری روش حساس و سریع تشخیصی ومقرون به صرفه همچون ایمونوهیستوشیمی برای تعیین موارد آلودگی به منظور انجام اقدامات پیشگیری و قرنطینه ای بسیار حائز اهمیت است.

اولین گزارش همه گیری بیماری IHN در آزاد ماهیان توسط Amend, D. F. (1970a) گزارش شده است.در طی سالهای ۱۹۴۰ تا ۱۹۵۰ همه گیریهای جدی در بین آزاد ماهیان جوان آمریکای شمالی گزارش شده است. گونه های دیگرآزاد ماهیان مانند ماهی آزاد سیاه –قزل آلای رنگین کمان –قزل آلای حلق بریده به ویروس عامل IHN حساس هستند(بهتر،حمیدرضا، ۱۳۷۷). عامل مولد بیماری یک نوع رابدوویروس RNAدار یک رشته ای (ssRNA) با ابعاد ویروس (۱۵۰-۱۹۰*۶۵-۷۵) می باشد. که به حرارت ، اسید (PH کمتر از ۴) ،اتر ،اشعه U.Vویدوفورها حساس است.این ویروس قادر به رشد روی تیره های سلولی همچونEPC، CHSE214, RTG-2در دمای ۴-۲۰ درجه سانتیگراد می باشد(سلطانی و همکاران۲۰۰۲ آرشیو رازی).

اولین علامت این بیماری مرگ و میر بیش از حد در بچه ماهیان انگشت قد بوده و در بیشتر موارد شیوع آن در دمای زیر ۱۵ درجه سانتیگراد میباشد (سلطانی، مهدی ۱۳۸۰). افزایش تغییرات هیستو پاتولوژیک با افزایش غلظت ویروس در ارتباط است و توسط میکروسکوپ الکترونی می توان ساختار ویروس را در قسمت کلیه قدامی وطحال ونیز پانکراس مشاهده کرد.

عمده علامت بالینی معمولا لاغری –شنای بدون تعادل - بی حالی - اسکولیوزیس و لوردوزیس- اگزوفتالمی- آسیت- کست مدفوعی سفید رنگ نسبتا سفت- تیرگی ناحیه خلفی بدن- پتشی در احشا و چربی های مزانتر می باشد(سلطانی ، مهدی ۱۳۸۰).

علایم هیستو پاتولوژیکی مهم شامل نکروز شدید سلولهای گرانولار دستگاه گوارش درسلولهای هسته دار ائوزینوفیلی لایه استراتوم گرانولوزوم واستراتوم کمپکتوم بوده و کانونهای نکروتیک کبدی به همراه ذخیره سروئیدی از علایم عمده دیگر می باشد. ونیز تغییرات دژنراتیو کانونی کلیه قدامی ونکروز بافتهای خونسازبه همراه دژنرسانس هیالن از نوع قطره ای در اپی تلیال توبولی به همراه سلولهای پیکنوزه وبه همراه افزایش سلولهای ماکروفاژ بین توبولی از نشانیهای میکروسکوپیک مهم می باشد. از آنجائیکه روش ایمونوهیستوشیمی در بررسی های ویروس شناسی و بیماریهای ویروسی در ایران جدید می باشد بنابراین اساس ، مواد و روشهای این تکنیک در زیر ارائه میگردد.

این روش که بعنوان یک شیوه جدید در امر تشخیص بیماریهای آبزیان برای نخستین بار در کشور تجربه می شود برای بررسی و شناسائی ترکیبات ایمونولوژیک مثل پروتئین های ویروسی که توسط آنتی بادی هائی که بر علیه این مواد اختصاصی باند میگردند بسیار سودمند می باشد.به این صورت که محل قرارگیری این مواد ایمونولوژیک دقیقا شناسائی می گردد(Localization-Ag) که در این مطالعه با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد IHN به همراه عمل کونژوگاسیون توسط مارکر اختصاصی (IgG-HRP) در کنار محلول کروموژن سوبسترا و با استفاده از رنگ هماتوکسیلین رنگ آمیزی اختصاصی بر روی نمونه های مقاطع پاتولوژیکی تهیه شده از بافت های هدف همچون کلیه قدامی –کبد –طحال- وقلب انجام می گردد.پس از انجام رنگ آمیزی کانونهای کمپلکس رنگی (Ag-Ab) بصورت قهوه ای –طلائی (Golden- Brown) مشخص میگردد. این کانونهای رنگی دلیل بر تکثیر ویروس و ایجاد کانونهای پروتئین ویروسی می باشد و در کنار سایر روشهای تشخیصی مثل کشت و جدا سازی ویروس ارزش تشخیصی بسیار بالائی دارد(Adams. A. Marin. M. 1994).

مواد مصرفی کار:

۱- انواع الکل (گزیلین/متانول/و الکل مطلق ۱۰۰٪-۹۵٪-۷۰٪-۵۰٪)

۲- کلروفورم /فرمالین خالص(۳۷٪)

۳- آب مقطر/آب اکسیژنه(۱۰٪)

۴- محلول کروموژن سوبسترا (3-3́Diaminobenzidine Tetrahydro chlorideیا DAB)

۵- کونژوگه F(ab́)2Rabbit Anti Mouse IgG-HRP

۶- آنتی بادی منوکلونال ضد IHNتهیه شده در خرگوش

۷- Nacl

۸- Trizma base

۹- سرم ماهی

۱۰- رنگ هماتوکسیلین

۱۱- تیومرسال

۱۲- بافر شستشو و رقیق کننده(TBS/Tris buffer saline)

۱۳- پارافین- چسب مونته

۱۴- لام و لامل

روش کار نمونه برداری:

طی ایام برنامه ریزی شده از خرداد ۱۳۸۳ لغایت اسفند ۸۳ از تعداد ۱۰۰ مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی واقع در ۱۷ استان کشور با مراجعه به مراکز یاد شده نسبت به اخذ نمونه های لازم شامل لاروها و بچه ماهیان در حال تلفات و دارای علائم بالینی تیپیک و یا موارد تلفات موردی بدون علایم بالینی تیپیک اقدام گردید. برای نمونه های مورد نظر از فیکساتیو فرمالین بافره ۱۰٪ استفاده که قبل از انتقال نمونه ها داخل فیکساتیو ابتدا یک برش در ناحیه شکمی ماهی جهت نفوذ بهتر فرمالین ایجاد می گردید.پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه کلیه اعمال آماده سازی نمونه ها طبق پروتکل تهیه مقاطع پاتولوژیکی بر روی نمونه های بافت های هدف مهم ماهی پس از انتخاب نمونه های مناسب در دستگاه هیستو تکنیک قرار داده می شد و پس پایان کار (۲۱ ساعت) مراحل بلوک گیری و تهیه مقاطع انجام می گردید.

برنامه زمان بندی دستگاه Tissue processure

۱	اتانول	٪۵۰	۱ ساعت
۲	اتانول	٪۷۰	۲ ساعت
۳	اتانول	٪۹۵	۲ ساعت
۴	اتانول	٪۹۵	۲ ساعت
۵	اتانول	٪۹۵	۲ ساعت
۶	الکل مطلق	٪۱۰۰	۲ ساعت
۷	الکل مطلق	٪۱۰۰	۲ ساعت
۸	کلروفورم	٪۱۰۰	۲ ساعت
۹	کلروفورم	٪۱۰۰	۱ ساعت
۱۰	پارافین	مذاب	۱ ساعت
۱۱	پارافین	مذاب	۲ ساعت
۱۲	پارافین	مذاب	۲ ساعت

جدول شماره (۱)-برنامه زمان بندی دستگاه هیستو تکنیک

طرز تهیه محلول های مورد نیاز در روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی:

۱- بافر شستشو یا بافر تریس (TBS)..... (نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد)

الف-Trizma base.....۶,۰۵g/lit

ب- Nacl ..... ۸,۷ g/lit

(PH توسط NaoHو HCL در ۷,۶ تنظیم میگردد) این محلول یک لیتر بصورت STOCK ساخته شده ونیازی به اتوکلاو ندارد.

۲-محلول کروموژن وسوبسترا

الف-محلول Stock: ۱۵ DAB + ۱۰ ml ... TBS mg

(PH=7.6) در تیوب های ۰,۵ ml تقسیم و در $-۲۰^{\circ C}$ درجه نگهداری گردد.

ب-محلول کاری: محلول ذخیره (۰,۵ml) + TBS(۵ml)

10%+(۰,۱ml) H2O2

۳-محلول رنگ آمیزی هماتوکسیلین

الف-هماتوکسیلین.....۲ گرم

ب-Sodium Iodate.....۰,۴ گرم

ج-Potasium alum.....۱۰۰ گرم

د-اسید سیتریک .....۲ گرم

ه-Chloral hydrate.....۱۰۰ گرم

و-آب مقطر .....۲۰۰۰ میلی لیتر

ابتدا موارد الف –ب-ج را در ۲ لیتر آب مقطر حل کرده و یک روز بعد بقیه مواد را اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در حالت جوش حرارت داده می شود.

۴-آب اکسیژنه ۱۰ ٪

Methanol 10 cc+ ۱۰ cc(خالص)H_2O_2

روش کار (متد رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی):

۱- لام ها در محلول H2O2 ۱۰٪ تهیه شده در متانول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده شده تا پراکسیداز سلولها از بین بروند.

۲- لام ها سه مرتبه با TBS شستشو داده شد

۳- لام ها در داخل سرم نرمال رقیق شده در TBS (۱:۱۰) به مدت ۱۰ دقیقه جهت بلوکه شدن سایت های غیر اختصاصی قرار داده شد

۴- بر روی لام ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آنتی بادی منوکلونال (۱:۸۰۰)رقیق شده با TBSاضافه شده و به مدت ۱ ساعت در انکوباسیون ۳۷ درجه نگهداری شد

۵- شستشو باTBSسه مرتبه

۶- اضافه کردن کونژوگه رقیق شده (۱:۵۰)در TBSوانکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه

۷- شستشو با TBS سه مرتبه

۸- اضافه کردن محلول سوبسترای حاوی کروموژن(محلول کاری) و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه و توقف واکنش با آبکشی لام ها

۹- رنگ آمیزی هماتوکسیلین به مدت ۳-۵ دقیقه

۱۰- تمیز سازی لام ها در آب لوله به مدت ۱۰ دقیقه

۱۱- دهیدراتاسیون بافتها به مدت ۳ دقیقه در اتانول (۷۰٪) و ۵ دقیقه در اتانول (۹۵٪) و دو تعویض ۵ دقیقه ای در اتانول ۱۰۰٪

۱۲- شفاف سازی بافت ها در گزیلل به مدت ۵ دقیقه

۱۳- مونته کردن و گذاشتن لامل بر روی لام

۱۴- مطالعه میکروسکوپیک با بزرگ نمائی ۲۰و۴۰و۱۰۰ و مشاهده ساختارهای رنگی قهوه ای –طلائی در بافت های هدف

نتایج:

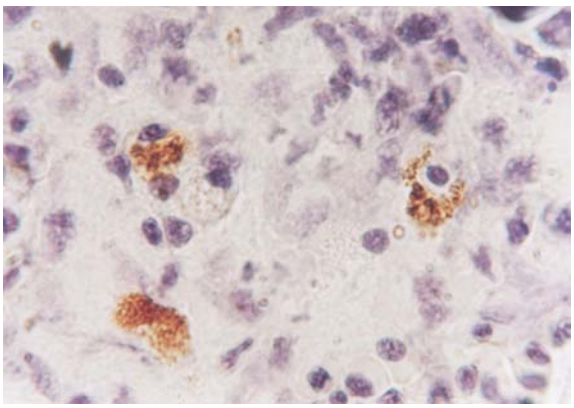
از تعداد ۱۰۰ مرکز تکثیر و پرورش مورد مطالعه تعداد ۳۵ مورد مثبت و تعداد ۶۵ مورد منفی بدست آمد. که از کل موارد بررسی شده ۳۸ مورد نیز دارای علائم بالینی و ۶۲ مورد بدون علائم بالینی بودند. نمونه های مثبت مربوط به استان های مازندران- کهگیلویه و بویر احمد-اردبیل- گیلان- فارس- آذربایجانشرقی- لرستان- مرکزی-اصفهان-چهار محال بختیاری- کردستان- قزوین- آذربایجانغربی- قم بوده که در جدول زیر اشاره شده است:

ردیف	استان	مراکز تحت بررسی	تعداد نمونه های مثبت	درصد آلودگی در سطح مراکز تحت بررسی استان
۱	مازندران	۱۳	۴	٪۳۰,۷۶
۲	کهگیلویه و بویر احمد	۱۰	۶	٪۶۰
۳	اردبیل	۶	۳	٪۵۰
۴	گیلان	۲	۱	٪۵۰
۵	فارس	۱۱	۴	٪۳۶,۳۶
۶	آذربایجان شرقی	۸	۳	٪۳۷,۵
۷	لرستان	۱۲	۱	٪۸,۳۳
۸	مرکزی	۲	۱	٪۵۰
۹	اصفهان	۹	۲	٪۲۲,۲۲
۱۰	چهار محال بختیاری	۱۰	۳	٪۳۰
۱۱	کردستان	۴	۲	٪۵۰
۱۲	قزوین	۲	۱	٪۵۰
۱۳	آذربایجانغربی	۴	۳	٪۷۵
۱۴	قم	۱	۱	٪۱۰۰
۹۴ مرکز ۳۵ مورد				

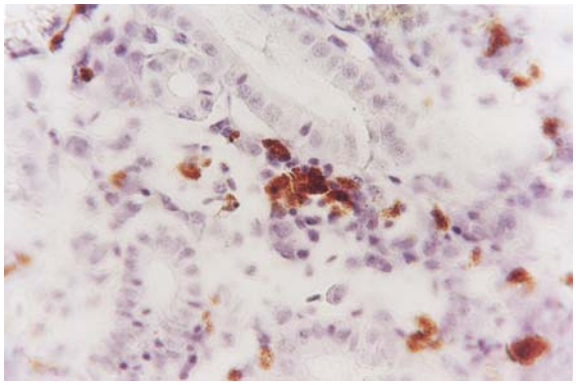
جدول شماره(۲)-نتایج مثبت از کل نمونه های آزمایش شده در ۱۰۰ مرکز تکثیر و پرورش در ۱۷ استان کشور

توضیح اینکه تعداد ۹ مرکز از کل ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه مربوط به استانهای کرمانشاه (۳ مرکز)-تهران (۲ مرکز) – کرمان (۱مرکز) فاقد آلودگی بودند که این ۳ استان از کل ۱۷ استان دارای آلودگی جدا گردیده است.

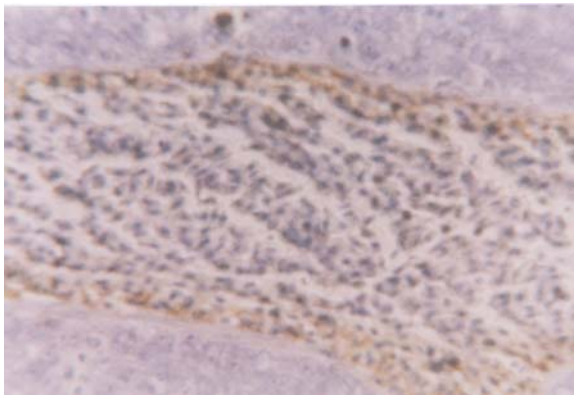
نگاره ها:



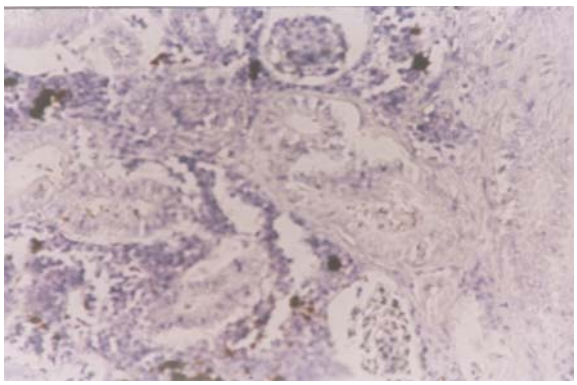
نگاره شماره ۱ : مقطع هیستوپاتولوژیک بافت طحال (S 25) رنگ آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد IHN که ترکیب رنگی آنتی ژن وآنتی بادی با رنگ قهوه ای طلائی داخل سیتوپلاسم سلول قابل روئیت بوده که هسته را به کنارزده است (بزرگنمائی ۱۲,۵×۱۰۰)



نگاره شماره ۲ : مقطع هیستو پاتولوژیک بافت کلیه (K 17) رنگ آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد IHN که ترکیب رنگی کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی با رنگ قهوه ای طلائی داخل سلول های مراکز خونساز کلیه مشاهده می گردد(Golden-Brown) تخریب نکروتیک سلولهای توبولی کلیه نیز مشخص است.(بزرگنمائی ۵×۱۰۰)



نگاره شماره ۳ : مقطع هیستوپاتولوژیک بافت کبد (L 4) رنگ آمیزی به روش ایمونوهیستو شیمی و تشکیل کمپلکس رنگی آنتی ژن و آنتی بادی در سلولهای آندوتلیال عروق سینوسوئیدی کبد (بزرگنمائی ۵×۴۰)



نگاره شماره ۴ : مقطع هیستوپاتولوژیک کلیه (K 8) رنگ آمیزی منفی ایمونوهیستوشیمی که ترکیب رنگی قهوه ای طلائی در کلیه ایجاد نگردیده است. (بزرگنمائی ۵×۲۵)

بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آلودگی و احتمال بروز بیماری IHN در صورت ایجاد سایر شرایط در برخی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای کشور می باشد.بطوریکه مشخص شد از تعداد کل ۱۰۰ مرکز بررسی شده در ۱۷ استان کشور تعداد ۳۵ مورد مثبت با این روش تشخیص داده شد.البته یافته های بالینی با پیش بینی بروز تلفات قابل توجه در برخی مراکز نمونه برداری شده در مراحل لاروی و در درجه حرارت زیر ۱۵ درجه سانتی گراد احتمال تشخیص بیماری را تقویت می نماید.با توجه به جدا سازی ویروس عامل بیماری از برخی مولدین (فلاحی ، روزبه ۲۰۰۲) به همراه یافته های ایمونوهیستوشیمی این مطالعه احتمال بروز بیماری نکروز عفونی مراکز خونساز ماهی قزل آلا در برخی از مزارع قزل

آلای کشور قوت می گیرد .با توجه به عدم مطالعه کامل پاتوژنیسیتی ویروس بررسیهای بیشتری نیاز است تا اولا ویروس عامل بیماری جداسازی شده وثانیا حدت آن مطالعه شود.به همین منظور علاوه بر ضرورت بررسی بیشتر اعمال مقررات پیشگیری و قرنطینه ای برای جلوگیری از انتشار بیماری ضرورت دارد.البته مشخص نمودن مقدار و حدت این آنتی ژن ویروسی به عوامل عمده ای مثل طول دوره کمون بیماری –توانائی دفاعی ماهی– عوامل جانبی استرس زا و عوامل محیطی در ارتباط با فصل و دما و تغییرات PH و نوسانات آنها وابسته می باشد.در بررسی انجام شده بیشتر موارد مثبت در مراکزی که در مناطق سردسیر (دمای زیر ۱۵ درجه سانتی گراد) کشور قرار داشته و به همراه علائم بالینی تیپیک بیماری بوده و با تلفات بالا در لاروها مشخص گردیده است.

البته سایر فاکتور ها نیز در بروز تظاهرات بالینی این بیماری نقش عمده ای دارند که یکی دیگر از آنها رعایت دقیق ضوابط بهداشتی و کنترلی در مراکز تکثیر و پرورش می باشد.در بررسی انجام شده مشخص شد که در مراکزی که کنترل های دقیق قرنطینه ای حاکم بود با اینکه نتایج ایمونوهیستو شیمی آنها مثبت می شد ولی به دلیل رعایت اصول بهداشتی چهره بالینی بیماری و تلفات شدید و حاد در این قبیل مراکز وجود نداشت مانند استانهای قزوین–اصفهان و لرستان.

البته باید توجه داشت که عدم بروز بیماری حاد به دلیل حدت دار نبودن سویه ویروس آلوده کننده نیز قابل توجیه است.هر چند توصیه اکید بر این است که از هر گونه نقل وانتقال محصولات چنین مراکزی باید اجتناب گردد که این موضوع با توجه به نحوه انتقال عامل بیماری به دو روش افقی و عمودی روشن می باشد.

در روش تشخیصی ایمونوهیستوشیمی قادر هستیم که در بافت های هدف مواد ایمونولوژیک مثل آنتی ژنهای ویروسی را با ایجاد کمپلکس های رنگی توسط اتصال آنتی ژن و آنتی بادی منوکلونال اختصاصی شناسائی نمائیم.که خود این می تواند موید آلودگی در بافت های هدف باشدکه توسط پروتئین های ویروسی عامل بیماری در سلول های آسیب ایجاد می گرددر واقع مزیت عمده این روش اینست که می توان آثار مخرب ویروس را به راحتی شناسائی کرد.البته احتمال این نیز وجود دارد که نتایج منفی حاصل از این روش علاوه بر عدم وجود بیماری به دلیل عدم دستیابی به سلولهای هدف آسیب دیده نیز باشد.در نهایت از موارد بررسی شده علائم بالینی تیپیک بیماری ۳۸ مورد علائم منتسب به IHN بوده است که در مقایسه انطباقی با نتایج ایمونوهیستوشیمی که ۳۵ مورد مثبت بوده دارای همپوشانی تا حد ۹۰٪ می باشد.

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 آلای کشور (آرشیو رازی)
- فلاحی،روزبه(۲۰۰۲)-مطالعه جداسازی و شناسایی رابدوویروس عامل بیماری نکروز مراکز خونساز در برخی کارگاههای قزل آلای 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 ۷۸-۷۷

- Adams .A .Marin . M . and Maho de 1994 Immunohistochemical detection of pathogens . In fish Immunology pp;133-144
- Amend, D. F. (1970a). Approved procedure for determining absecnce of infectious haemato poitic necrosis (IHN) in salmonid fishes. U.S. Fish wild. Sevv. Fish Dis. Leaflet 31.
- OIE (2005) Diagnotic Manual for Aquatic animal disease office International des Epizootics،paris