"مقاله پژوهشی"

مقایسه کیفیت تشخیص بتانوداویروس در ماهیان هامور و سی باس از طریق کیت تشخیص سریع، آسیب شناسی و روش Nested-PCR

مینازیارتی[۱]، سیدمحمدجلیل ذریه زهرا[۲]*

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد جهرم، دانشگاه آزاداسلامی، جهرم، ایران

۲- مدیریت اطلاعات و ارتباطات علمی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۱

چکیده

بتانوداویروس یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر ویروسی در ماهیان سرتاسر جهان و مانعی اساسی در گسترش شیلات و آبزی‌پروری است. با توجه به افزایش آبزی پروری دریایی و پروژه‌های پرورش ماهی در قفس در خلیج فارس و بروز برخی علائم بیماری در ماهیان پرورشی و وحشی منطقه، غربالگری ماهیان حساس به بتانوداویروس از اهمیت خاصی برخوردار است. لذا، برای جلوگیری از خسارات اقتصادی و کاهش ذخایر آبزیان، دو گونه اقتصادی مهم خلیج فارس، هامور ماهیان وحشی و سی باس آسیایی پرورشی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. پژوهش حاضر با بررسی بر روی ۱۵۰ قطعه ماهی و سه روش تشخیصی (کیت تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی، آسیب شناسی و روش Nested-PCR) انجام شد و در نهایت کیفیت تشخیص روش‌ها، مورد مقایسه و ارزیابی لازم قرار گرفتند. نتایج آزمایش‌های انجام‌شده توسط سه روش مذکور، برای نخستین بار در کشور موارد مثبتی از بتانوداویروس را در هر دو گونه مورد مطالعه آشکار ساخت. آنالیز داده‌ها و مقایسه سه روش تشخیصی نیز، Nested-PCR را به عنوان حساس‌ترین روش و کیت ایمونوکروماتوگرافی را به عنوان سریع‌ترین و ارزان‌ترین روش قبل از شیوع بیماری، معرفی می‌کند. بنابراین با گسترش آبزی‌پروری در سواحل جنوبی ایران و افزایش گونه‌های وارداتی، انتخاب روش مناسب برای غربالگری ماهیان مستعد در شناسایی زودهنگام بتانوداویروس،اهمیت زیادی داشته و برای پیشبرد اهداف اقتصادی صنعت شیلات و آبزی‌پروری می‌تواند مورد بهره‌برداری لازم قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بتانوداویروس، کیت ایمونوکروماتوگرافی، Nested-PCR، آسیب‌شناسی.

* عهده‌دار مکاتبات: m.zorriehzahra@areeo.ac.ir

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]

[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

مقدمه

ویروس نکروز عصبی یا NNV (Nervous Necrosis Virus) عامل ایجاد بیماری VNN (Viral Nervous Necrosis) است (Ariff *et al*., 2019). این بیماری اولین بار در دهه ۱۹۸۰ توصیف شد و از آن زمان تاکنون باعث مرگ و میر و زیان‌های اقتصادی جدی بی‌شماری در انواع ماهیان دریایی و آب شیرین شده است. NNV از جنس بتانوداویروس و خانواده نیدوویریده، ویروسی کوچک فاقد پوشش و دارای ژنوم قطعه قطعه معروف به RNA1 و RNA2 است. قطعه بزرگ‌تر، RNA1، کدکننده RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) و قطعه کوچک‌تر، RNA2، کدکننده پروتئین کپسید است (Mori *et al*., 1992; Bandin and Souto, 2020). بتانوداویروس در چهار ژنوتیپ با دامنه دمایی متفاوت شناخته‌شده که شامل موارد ذیل است: BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus: ۱۵–۲۰C؛ TPNNV (Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus): ۲۰C؛ SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus: ۲۰–۲۵C؛ RGNNV (Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus: ۲۵–۳۰C) (Nylend *et al*., 2008). ژنوتیپ RGNNV با بیش‌ترین تعداد گونه‌های حساس، بالاترین توزیع را در سرتاسر جهان به ویژه در ماهیان مناطق گرمسیری و معتدل دارد. مطالعات نشان داده که پراکنش جغرافیایی RGNNV به طور گسترده‌ای در میان ماهیان وحشی و پرورشی حوضه مدیترانه و سواحل آسیا و استرالیا وجود دارد (Moody *et al*., 2009; Nishioka *et al*., 2016). دما به عنوان یک عامل محیطی، تاثیر مهمی بر ویروس‌های ماهیان دارد و این اثر را می‌توان در VNN با دمای بهینه رشد متفاوت، مشاهده نمود (Maltese and Bovo, 2007). یک مطالعه نشان‌داده که ژنوتیپ های بتانوداویروس به شدت با موقعیت جغرافیایی و دمای آب مرتبط هستند (Hata *et al*., 2010).

تغییرات دما در محیط زندگی آبزیان، توانسته تاثیرات زیادی را بر زیست بوم‌های آبی و اپیدمیولوژی بیماری‌های عفونی در آبزیان ایجاد کند. تعداد زیادی از گونه‌های ماهیان وحشی به حاملین بدون علامت VNNV در کشورهای آسیایی و مدیترانه‌ای تبدیل شده‌اند که این موضوع سبب افزایش میزان آلودگی ویروسی و متعاقب آن شیوع مرگ و میر درمحیط‌های آلوده هنگام افزایش دمای آب از ۱۶ به ۲۲ درجه سانتیگراد شده است (Bandin and Souto, 2020).

این بیماری روش‌های تشخیصی متفاوتی دارد، اما تشخیص‌های اولیه براساس مشاهده چگونگی شنای ماهیان مبتلا و سپس ضایعات بافتی در مغز و چشم ماهیان آلوده است (Mori *et al*., 1991; Yoshikoshi *et al*., 1990). سایر روش‌های تشخیصی همچون کیت‌های تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی و روش Nested-PCR نیز مطرح شده است. تاکنون چندین روش PCR (RT-PCR, Nested PCR ,RT-qPCR) با هدف یک یا هر دو بخش ژنومی ویروس، گزارش شده است (Bandin and Souto, 2020). در مجموع روش های تشخیص مولکولی بسیار قابل اعتماد و تکرارپذیر هستند و در حال حاضر اهمیت زیادی دارند (Binesh and Jithendran, 2020). Nishizawa و همکاران اولین روش RT-PCR را براساس تکثیر قطعه ۴۳۰bp از منطقه T4 گزارش کردند که منجر به طبقه‌بندی فعلی NNV شد و به طور گسترده‌ای برای تشخیص جدایه‌های جدید از مناطق مختلف جغرافیایی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

مورد استفاده قرار گرفت (Nishizawa *et al.*,1995). البته در ابتدا برخی از مشکلات شناسایی این ویروس به دلیل وجود تنوع ژنتیکی وجود داشت؛ لذا پروتکل‌های جدید با هدف قرار دادن مناطق حفاظت شده RNA2 توسعه یافته است (Toubanaki and Karagouni, 2017). از طرف دیگر مطالعات اپیدمیولوژیک توزیع گسترده NNV، به ویژه RGNNV و افزایش گونه‌های حساس را در میان ماهیان دریایی، پرورشی و زینتی نشان می‌دهد (Bandin and Souto, 2020). با افزایش آبزی‌پروری دریایی در دهه گذشته و استفاده از گونه‌های وارداتی، بروز برخی علائم در ماهیان دریایی و پرورشی مشاهده شده است و با تلفات دوره‌ای ماهیان در سواحل جنوبی، نگرانی تشخیص زودهنگام بیماری بتانوداویروس اهمیت دوچندان یافته است. از طرفی به دلیل شیوع گسترده بتانوداویروس و ایجاد مشکلات جدی در صنایع شیلات و آبزی‌پروری جهان، روش‌های تشخیص قابل اعتماد و سریع، به طور چشمگیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. بنابراین، برای به حداقل رساندن تلفات ماهیان و کاهش خطر انقراض گونه‌های در معرض خطر، غربالگری ماهیان حساس به بتانوداویروس با روش‌های سریع و متفاوت، ارزشمند خواهد بود. به ویژه آشنایی با انواع روش‌های دردسترس و بررسی مقایسه‌ای کیفیت و ارزیابی آنان در مقاله حاضر، کمک شایانی به حفظ صنعت شیلات و آبزیان منطقه خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

در بهار و تابستان سال ۱۳۹۸، به دنبال مرگ و میر برخی از ماهیان دریایی و پرورشی سواحل خلیج فارس (استان‌های بوشهر و هرمزگان)، نمونه برداری از دو گونه ماهی حساس به بتانوداویروس انجام شد و همزمان با نمونه‌برداری دمای آب دریا نیز مورد سنجش قرار گرفت و تغییرات دمایی ثبت گردید. در مجموع، ۳۰ قطعه ماهی هامور (Epinephelus) وحشی و ۱۲۰ قطعه ماهی سی‌باس آسیایی (*Asian Sea bass*) پرورش‌یافته در قفس جمع‌آوری شد و به طور مجزا از یکدیگر و با رعایت زنجیره سرد، به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم ارسال گردیدند. در طی نمونه‌گیری تصادفی، ماهیانی با علایم رفتاری شنای نامتقارن و نشانه‌های ظاهری همچون سرخی چشم و تورم شکمی در اولویت انتخاب بودند (شکل۱). به محض ورود نمونه‌ها به آزمایشگاه، وزن و طول نمونه‌ها اخذ شد (شکل۲) و با توجه به نوع آزمایش مورد نظر، کدگذاری و تفکیک انجام گردید.



شکل۱: علائم ظاهری ماهیان مبتلا: الف) سرخی چشم ماهی سی باس پرورشی، ب) تورم شکمی ماهی هامور وحشی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]



شکل۲: اندازه گیری وزن و طول ماهیان

کیت تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی

برای روش مذکور، در شرایط کاملاً استریل، بافت مغز و چشم ماهیان خارج شد و به طور مجزا با محلول نمک فسفات همگن گردیدند و پس از سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۲۵g، سوپرناتانت به‌دست آمده، درون چاهک کیت قرار داده شد. پس از گذشت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه و ظهور نوارهای رنگی، نتایج مثبت یا منفی نمونه‌ها قرائت و تفسیر نتایج طبق پروتکل کیت انجام شد (حسن تبار، ۱۳۹۷).

روش آسیب شناسی

در این روش، مغز و چشم ماهیان به طور مستقل، در بافر فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد. بعد از آبگیری بافت‌ها در الکل، بلوک‌های پارافینه تهیه و برش با دستگاه میکروتوم (Microm, Germany) انجام شد. در نهایت بافت‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مشاهده گردید (Zorriehzahra *et al*., 2014).

روش Nested-PCR

برای شروع کار و سنتز cDNA، RNA از بافت مغز و چشم ماهیان، با استفاده از کیت IQ2000 و مطابق پروتکل شرکت‌سازنده آن استخراج و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. واکنش Nested PCRدر دو مرحله و با استفاده از یک جفت آغازگر خارجی (F2/R2) و یک جفت آغازگر داخلی (F2´/R2´) مطابق پروتکل OIE, 2018 صورت گرفت (جدول۱) (OIE, 2018).

جدول۱: اطلاعات آغازگرهای مورداستفاده در واکنش Nested PCR

آغازگر	هدف	توالی ′۳-′۵	سایز باند	منابع
F2 R3	RNA2	CGTGTCAGTCATGTGTCGCT CGAGTCAACACGGGTGAAGA	۴۲۰bp	Nishizowa *et al*., 1994
F'2 R'2	RNA2	GTTCCCTGTACAACGATTCC GGATTTGACGGGGCTGCTCA	۲۹۴bp	Thiery *et al*., 1999b

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

مرحله اول واکنش با اندک تغییراتی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با محصولات سیناکلون: بافر PCR x۱۰: ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیوم۵۰ میلی‌مولار: ۰/۷۵ میکرولیتر، دی‌ان‌تی‌پی‌میکس۲۰۰ میلی‌مولار: ۰/۵میکرولیتر، ۱میکرولیتر از هر آغازگر، تک دی‌ان‌آ پلیمراز (u/µ ۵): ۰/۳ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از cDNA بدست آمده و میزان کافی آب مقطر جهت به حجم رساندن) انجام شد. با در نظر گرفتن ۲۰ سیکل و طول باند ۴۲۰bp، برنامه زمانی و دمایی واکنش مطابق جدول۲ اعمال گردید. مرحله دوم Nested-PCR نیز با تغییرات جزئی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با محصولات سیناکلون (بافر PCR x۱: ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیوم۵۰ میلی‌مولار: ۰/۷۵ میکرولیتر، دی‌ان‌تی‌پی‌میکس ۲۰۰ میلی‌مولار: ۰/۵ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر از محصول واکنش مرحله اول PCR و میزان کافی آب مقطر جهت به حجم رساندن) انجام شد. با در نظر گرفتن ۳۲ سیکل و طول باند ۲۹۴bp، برنامه زمانی و دمایی واکنش مطابق جدول۳ صورت گرفت. طی هر واکنش، جهت اطمینان از نتایج، نمونه کنترل مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام مراحل، محصولات واکنش به ژل الکتروفورز ۲٪ اضافه شده و سپس با اتیدیم بروماید رنگ آمیزی و باندها با دستگاه UV (Syngene, England) مورد مشاهده و بررسی قرارگرفتند (حسن تبار و همکاران، ۱۳۹۷؛ Thiery *et al*., 1999b).

جدول۲: برنامه دمایی و زمانی مرحله اول Nested-PCR

مراحل انجام واکنش	درجه حرارت (سانتیگراد)	مدت‌ز مان
- واسرشت سازی اولیه (جدایی دو رشته DNA)	۹۴ درجه	۵ دقیقه
- واسرشت سازی هر رشته	۹۴ درجه	۳۰ ثانیه
- اتصال آغازگر به توالی هدف در DNA	۵۵ درجه	۳۰ ثانیه
- بسط و ساخت رشته جدید	۷۲ درجه	۳۰ ثانیه
- تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۵ دقیقه

جدول۳: برنامه دمایی و زمانی مرحله دوم Nested-PCR

مراحل انجام واکنش	درجه حرارت (سانتیگراد)	مدت زمان
واسرشت سازی اولیه(جدایی دو رشته DNA)	۹۴ درجه	۵ دقیقه
واسرشت سازی هر رشته	۹۴ درجه	۴۰ ثانیه
اتصال آغازگر به توالی هدف در DNA	۵۰ درجه	۴۰ ثانیه
بسط و ساخت رشته جدید	۷۲ درجه	۴۰ ثانیه
تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۱۰ دقیقه

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

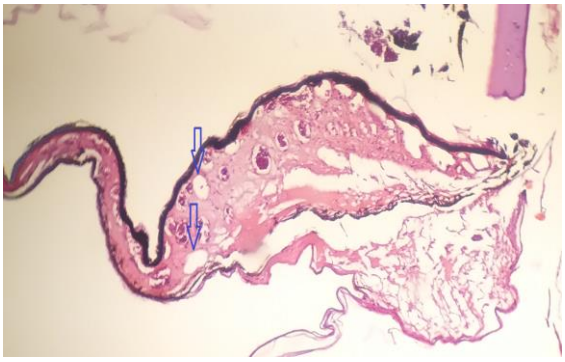
نتایج

ماهیان مورد مطالعه دارای طول و وزن متفاوتی بودند که میانگین وزن و قد آن ها به ترتیب ۳۰۰ گرم و ۱۸ سانتی متر بود. تغییرات دمایی ثبت شده در بهار و تابستان از ۲۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشت. در این بررسی ۲۲٪ از ماهیان مورد آزمون با روش کیت تشخیص سریع ایمنوکروماتوگرافی، مثبت گزارش شدند (شکل۳).

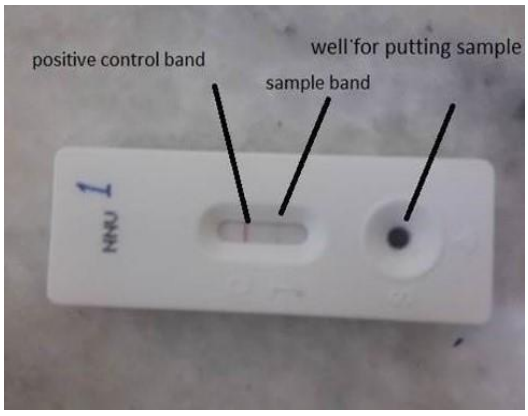
نمونه‌های بافتی مورد بررسی به روش آسیب‌شناسی، واکوئلاسیون و نکروز بافت مغز و چشم ماهیان (شکل۴) را آشکار نمودند و در نهایت ۲۸٪ از نمونه‌های موردبررسی با این روش، مثبت گزارش شدند.

از تعداد نمونه‌هایی که با Nested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، حدود ۳۶٪ از نمونه ها، باند bp ۲۹۴ را آشکار نمودند (شکل۵). جدول۴ تعداد ماهیان هرگونه و تعداد و درصد هر روش به تفکیک ذکر شده است.

در نهایت پس از انجام آزمایش ها و آنالیز نتایج و مقایسه موارد مثبت شده هرکدام از روش ها، نتایج قابل توجهی به‌دست آمد که خلاصه ای از آن در جدول۵ ارایه شده است. نتایج بررسی داده ها و برآورد زمان و هزینه آزمایش های انجام‌شده در پژوهش حاضر، حاکی از این مطلب بود که روش کیت سریع ایمونوکروماتوگرافی به عنوان سریع‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیصی و Nested PCR حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش‌های این مطالعه معرفی شدند.



شکل۴: نمونه واکوئلاسیون بافت شبکیه چشم ماهی سی باس (Ziarati *et al.*, 2020)

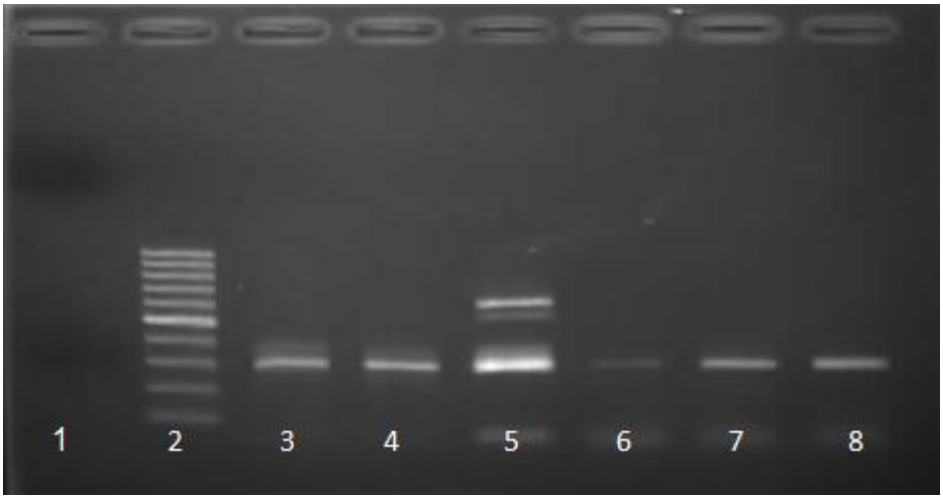


شکل۳: کیت تشخیص VNN و نمایش نتایج مثبت

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

جدول۴: تعداد گونه ماهیان مورد مطالعه، درصد و تعداد موارد مثبت هر گونه به تفکیک روش‌های انجام‌شده

نتایج روش‌ها/گونه ماهیان	مثبت روش کیت/ تعداد	مثبت روش آسیب‌شناسی/ تعداد	مثبت روش مولکولی/تعداد
ماهی هامور	۱۰/۲	۱۰/۴	۱۰/۶
ماهی سی‌باس	۴۰/۹	۴۰/۱۰	۴۰/۱۲
تعداد مثبت/تعداد کل	۵۰/۱۱	۵۰/۱۴	۵۰/۱۸
درصد مثبت/درصد کل	۱۰۰/۲۲	۱۰۰/۲۸	۱۰۰/۳۶



شکل۵: باند نمونه‌های ارزیابی شده با روش Nested-PCR. از سمت چپ به راست: ۱) کنترل منفی، ۲) Ladder، (۳ تا۷) : نمونه‌های مثبت، ۸) کنترل مثبت

جدول ۵: مقایسه سه روش ارزیابی‌شده مطالعه حاضر (+++: زیاد؛ ++: متوسط؛ +: کم)

نوع روش	سرعت تشخیص	هزینه	حساسیت و اختصاصیت	اولویت انتخاب
کیت تشخیص سریع	+++	+	++	++
آسیب شناسی	+	+++	++	+
Nested-PCR	++	+++	+++	+++

بحث

در چند دهه اخیر، بروز بیماری و کاهش صید، خلأیی میان عرضه و تقاضای ماهی ایجادکرده که تهدیدی برای صنعت ماهیگیری و آبزی پروری است (Azad *et al.*, 2014). بتانوداویروس به عنوان یک عامل بیماریزای ویروسی قابل توجه در ماهیان، مرگ و میر انبوه آنان را در سنین مختلف و به خصوص مراحل

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

لاروی ایجاد می‌کند (Hazreen-Nita *et al*., 2019) و تشخیص زودهنگام این ویروس می تواند خطر تلفات و خسارات اقتصادی ناشی از آن را در تاسیسات پرورش آبزیان به میزان قابل توجهی کاهش دهد (Binesh and Jithendran, 2020). محققین مختلف سراسر جهان، انتقال افقی (Hick *et al*., 2011a; Le Breton *et al*., 1997) و انتقال عمودی ویروس (Arimoto *et al*., 1992; Azad *et al*., 2006b; Breuil *et al*., 1991; Kuo *et al*., 2012) را تایید کرده‌اند. از طرفی خلیج فارس دریایی نیمه بسته و مرتبط با دریای عمان، اقیانوس هند و سایر دریاهای آزاد است (ذریه زهرا و همکاران، ۱۳۹۱؛ عوفی و همکاران، ۱۳۹۵؛ زیارتی و همکاران، ۱۴۰۰) و با توجه به آلودگی بتانوداویروسی ماهیان کشورهای همجوار ایران، همچون کویت و عربستان سعودی، احتمال وجود این ویروس و انتقال میان ماهیان دریایی و پرورشی خلیج فارس مطرح است لذا غربالگری ماهیان حساس به بتانوداویروس با روش‌های تشخیصی سریع، کارآمد و اختصاصی از ارزش بالایی برخوردار است. در مطالعه حاضر، به منظور بررسی اولیه ماهیان هامور وحشی و سی باس پرورشی برای تشخیصی VNN، ابتدا کیت تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی، مورد استفاده قرار گرفت. کیت طراحی شده توسط محققین ایرانی و با حد تشخیص^{3}۱۰ پارتیکل ویروسی در نمونه، که برای غربالگری اولیه ویروس قبل از شیوع در جمعیت‌های مورد نظر، بسیار مناسب و اقتصادی می باشد اما نتایج آن نسبت به روش مولکولی دارای حساسیت پایین‌تری است و گاهی نتایج منفی کاذب را آشکار می‌کرد و این با مطالعه حسن تبار و همکاران (۱۳۹۷) و همچنین با مطالعه Fukuda و همکاران (۲۰۰۹) همخوانی داشت (حسن تبار، ۱۳۹۷؛ Fukuda *et al*., 2006). همچنین Fukuda و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که حساسیت کیت طراحی‌شده بالاتر از روش آسیب‌شناسی بود و حد تشخیص ویروس ^{4}۱۰ کپی در هر میلی لیتر ارایه شد (Fukuda *et al*., 2006) ولی نتایج آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر که روش آسیب‌شناسی را بالاتر از کیت نشان داد، مطابقت نداشت. مهم‌ترین مزیت روش کیت ارزان بودن، راحتی، قابلیت حمل آسان و بدون نیاز به اپراتور ماهر و دستگاه‌های گران‌قیمت می باشد (Adams and Thampson, 2008). بنابراین برای تایید و کنترل عفونت VNN قبل از شیوع بیماری شیوه بسیار مناسبی است و بدون نیاز به نیروی متخصص و در هر مکانی قابل استفاده است. در مطالعه حاضر، روش Nested PCR نیز موفق شد برای اولین بار در کشور بیماری VNN را در ماهیان هامور وحشی و سی باس پرورشی وارداتی سواحل جنوب و جنوب غرب ایران (استان‌های بوشهر و هرمزگان) آشکار نماید و نتایج پژوهش کنونی مشابه مطالعه Banerjee و همکاران (۲۰۱۴) بود که آنان نیز به دنبال ظهور علایم بالینی و شیوع بیماری در ماهیان سی‌باس پرورش‌یافته در قفس از سواحل غربی هندوستان، بیماری را با روش Nested PCR تشخیص دادند (Banerjee *et al*., 2014). De la Pena و همکاران (۲۰۱۱) نیز با انجام آزمایش Nested-PCR روی آبشش ماهیان و ماهیان گرفته‌شده از دریا پیشنهاد عفونی‌شدن قبلی ماهیان و پایداری آن در جمعیت ماهیان وحشی را ارایه نمودند (De la Pena *et al*., 2011). در مطالعه دیگری ماهیان مهاجر دریایی به عنوان ناقل مناسب انتقال بتانوداویروس به مناطق دوردست جغرافیایی معرفی شده‌اند (Curtis *et al*., 2001). Korsnes (۲۰۰۸) نیز انواع انتقال افقی ویروس

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

را متذکر شد که از جمله می‌توان به انتقال افقی میان ماهیان وحشی و ماهیان پرورشی، انتقال افقی میان جوامع ماهیان وحشی و یا میان جوامع ماهیان پرورشی، استفاده از ماهیان عفونی به کار گرفته شده در سیستم پرورشی یا افزایش ذخایر ماهیان وحشی اشاره کرد (Korsnes, 2008). بنابراین آلودگی ماهیان سواحل خلیج فارس ممکن است ناشی از هرکدام از موارد مذکور یا از طریق ماهیان پرورشی وارداتی باشد. مطابق انجام روش های مدنظر در این پژوهش، مشخص شد که روش کیت ایمونوکروماتوگرافی ارزان‌ترین و سریع ترین روش تشخیصی است و در عین حال حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به سایر روش ها دارد. در مقابل روش آسیب شناسی از نظر اختصاصیت و حساسیت تقریبا مشابه با روش کیت بود با این تفاوت که انجام مراحل کار و کسب نتایج مطلوب، مستلزم سپری نمودن وقت و هزینه زیاد و همچنین نیازمند پرسنل ماهر و دستگاه های گران‌قیمت است. اما روش Nested-PCR کنونی، روشی حساس و اختصاصی معرفی شده و در مقایسه با روش آسیب‌شناسی از سرعت عمل بیشتری برخوردار است ولی مشابه روش آسیب شناسی، نیازمند هزینه، نیروی متخصص و دستگاه های پیشرفته است. به طور کلی با توجه به موارد مطرح شده می توان اولویت اول را روش های مولکولی در نظر گرفت ولی در زمان ضیق وقت و نبود پرسنل ماهر، استفاده از کیت تشخیص سریع بسیار ارزشمند است. همچنین روش آسیب شناسی برای تشخیص بتانوداویروس و مشاهده اثرات آن بر بافت میزبان کاربرد دارد ولی زمان بیشتری می طلبد. نتایج کنونی در تشخیص بتانوداویروس، Nested-PCR راه اندازی شده را قابل اعتمادتر از دو روش دیگر گزارش نمود و شناسایی بتانوداویروس در سی‌باس وارداتی و هامور وحشی خلیج فارس را، یک تایید نتایج محققان قبلی و دلیلی بر انتقال افقی ویروس میان ماهیان منطقه اعلام می‌نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند که از مساعدت جناب دکتر اشکان اژدری در جمع‌آوری و ارسال ماهیان سی‌باس پرورشی و همچنین از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

۱. حسن تبار، ف.، ۱۳۹۷. امکان سنجی ساخت کیت تشخیص سریع بیماری نکروز عصبی ویروسی به منظور ردیابی سریع بیماری (VNN) با استفاده از تست ایمونوکروماتوگرافی و مقایسه آن با روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) و ایمنوهیستوشیمیIHC . رساله دکترای تخصصی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۱۴۶ صفحه.

۲. حسن تبار، ف.، فیروزبخش، ف.، ذریه زهرا، م.ج.، تامپسون، ک.، ۱۳۹۷. معرفی روش مولکولی PCR آشیانه ای Nested RT-PCR اصلاح شده جدید جهت تشخیص سریع بیماری نکروز عصبی ویروسی(Viral Nervous Necrosis). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۶)، ۱۱۵-۱۲۶.

۳. زیارتی، م.، ذریه زهرا، س.ج.،کفیل زاده، ف.، کارگر، م.، قاسمی، ف.، ۱۴۰۰. مروری بر بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) و خطرات آن بر

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

پرورش ماهیان دریایی و آبزی پروری در آبهای جنوب ایران. توسعه آبزی پروری، ۱۵(۲)، ۶۷-۸۵.

۴. ذریه زهرا، م.ج.، قاسمی، م.، کوهکن، ا.، ۱۳۹۱. بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در آبزیان: گذشته، حال، آینده. توسعه آبزی پروری، ۶(۱)، ۱۹-۵۵.

۵. عوفی، ف.، ربانی، م.، کد، ب.، لایت، ج.، ۱۳۹۵. تنوع گونه ای و طبقه بندی زیستگاهی ماهیان خلیج فارس. دومین همایش ملی توسعه پایدار دریا محور، ۶ صفحه.

6. Adams, A., Thompson, K.D., 2008. Recent applications of biotechnology to novel diagnostics for aquatic animals. Revue scientifiqueet technique (International Office of Epizootics), 27(1), 197-209.
7. Ariff, N., Abdullah, A., Azmai, M.N.A., Musa, N., Zainathan, S.C., 2019. Risk factors associated with viral nervous necrosis in hybrid groupers in Malaysia and the high similarity of its causative agent nervous necrosis virus to reassortant red-spotted grouper nervous necrosis virus/striped jack nervous necrosis virus strains. Veterinary World, EISSN, 2231-0916.
8. Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K., Furusawa, I., 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Fish Pathology, 27, 191-195.
9. Azad, I.S., Shekhar, M.S., Thirunavukkarasua, A.R., Jithendran, K.P., 2006b. Viral nerve necrosis in hatchery-produced fry of Asian seabass (*Lates calcarifer*): sequential microscopic analysis of histopathology. Disease of Aquatic Organisms, 73, 123-130.
10. Azad, I.S., Al-Abdul Elah, K., 2014. VNN: A Challenge to Mariculture in the Arabian Region with a Special Reference to Kuwait, East Asia Conference (Vietnam).
11. Bandin I., Souto S., 2020. Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review. Pathogens, 9, 106.
12. Banerjee, D., Hamod, M.A., Suresh, Th., Karunasagar, I., 2014. Isolation and characterization of a nodavirus associated with mass mortality in Asian seabass (Lates calcarifer) from the west coast of India. Virus Diseases, 25(4), 425-429.
13. Binesh, C.P., Jithendran, K.P., 2020. Development of a Nested rt-PCR Assay for Diagnosis of Acute as well as Asymptomatic Betanodavirus Infection in Fishes, Journal of Aquatic Biology & Fisheries, 8, 1-5.
14. Breuil, G., Bonami, J.R., Pepin, J.F., Pichot, Y., 1991. Viral infection (picorna like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (Dicentrarchus labrax) larvae and juveniles. Aquaculture, 97, 109-116.
15. Curtis, P.A., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R.P., Gendron, A.P., 2001. Nodavirus infection of juvenile white seabass, Atractoscion nobilis, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. Journal of Fish Diseases, 24, 263-271.
16. De La Peña, L.D., Suarnaba, V.S., Capulos, G.C., Santos, M.N.M., 2011. Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) virus in wild-caught and trash fish in the Philippines. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 31(4), 129.
17. Fukuda, K., Kondo, M., Inagawa, H., Chongthaleong, A., Becerra, L., Nishi, K., Okuyama, A., Aoki, T., Takahashi, Y., 2009. Development and Evaluation of an Immunochromatography Kit for Detection of White Spot Virus in Shrimp. Aquaculture Science, 57(3), 437-447.
18. Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K. and Nakai, T., (2010) Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. Archive of Virology, 155(10), 1597-1606.
19. Hazreen-Nita, M., Azila, A., Mukai, Y., Firdaus-Nawi, M., Nur-Nazifah, M., 2019. A review of betanodavirus vaccination as

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.3.3.9]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.3.21]

(SJNNV) Isolated from asymptomatic wild Japanese jack mackerel *Trachurus japonicus*. Fish Pathology, 51, 176-183.

29. Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K., 1995. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish Journal of General Virology, 76, 1563-1569.
30. OIE., 2018. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. CHAPTER 2.3.12, VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY.
31. Yoshikoshi, K.¸Inoue, K., 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases, 13, 69-77.
32. Thiery, R., Raimond, J.C., Castric, J., 1999b. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, Dicentrarchus labrax: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Virus Research, 63: 11-17.
33. Toubanaki, D.K., Karagouni, E., 2017. Genotype-specific real-time PCR combined with high-resolution melting analysis for rapid identification of red-spotted grouper nervous necrosis virus. Archive of Virology, 162, 2315-2328.
34. Ziarati, M., Zorriehzahra¸ M.E.J., Kafilzadeh, F., Kargar, M., Ghasemei, F., 2020. Betanodavirus monitoring in marine and farmed fish using molecular methods, histopathology and cell culture in Iran, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Faculty of Microbiology, Ph. D Thesis, P. 142.
35. Zorriehzahra¸ M.J., Nazari, A., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, M., Bovo, G., Daud, H.H.M., 2014. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. VirusDisease, 25(4), 430-436.

preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. Aquaculture International, 1-13.

20. Hick, P., Schipp, G., Bosmans, J., Humphrey, J., Whittington, R., 2011a. Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (Lates calcarifer) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. Aquaculture, 319: 41-52.
21. Korsnes, K., 2008. Nervous Necrosis Virus (NNV) in farmed Norwegian fish species. The thesis of the PhD. Department of the Molecular Biology University of Bergen.
22. Kuo, H.C., Wang, T.Y., Hsu, H.H., Chen, P.P., Lee, S.H., Chen, Y.M., Tsa, T.J., Wang, C.K., Ku, H.T., Lee, G.B., 2012. Nervous necrosis virus replicates following the embryo development and dual infection with iridovirus at juvenile stage in grouper. PloS One, 7: e36183.
23. Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J., Ollevier, F., 1997. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, Dicentrarchus labrax (L.). Journal of Fish Diseases, 20, 145-151.
24. Maltese, C., Bovo, G., 2007. Monografie Viral encephalopathy and retinopathy Encefalopatia e retinopatia virale. Ittiopatologia, 4, 93-146.
25. Moody, N.J.G., Horwood, P.F., Reynolds, A., Mahony, T.J., Anderson, I.G., Oakey, H.J., 2009. Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. Disease of Aquatic Organisms, 87, 151-160.
26. Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T., Kanno, T., 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of red spotted grouper. Fish Pathology, 26, 209-210.
27. Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K., Furusawa, I., 1992. Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (Pseudocaranx dentex) with nervous necrosis. Virology, 187, 368-371.
28. Nishioka, T., Sugaya, T., Kawato, Y., Mori, K., Nakai, T., 2016. Pathogenicity of striped jack nervous necrosis virus