

## "مقاله مروری"

## مروری بر بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) و خطرات آن بر پرورش ماهیان دریایی و آبی پروری در آب‌های جنوب ایران

مینازیارتی<sup>۱</sup>، محمدجلیل ذریه زهرا<sup>۱\*</sup>، فرشید کفیل زاده<sup>۱</sup>، محمد کارگر<sup>۱</sup>، فرنگیس قاسمی<sup>۲</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، 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

۳. گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاداسلامی، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹

### چکیده

بتانوداویروس به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت ماهیان مطرح بوده و موجب آسیب جدی و خسارات اقتصادی عمده به پرورش ماهیان دریایی و آبی پروری کشور می‌گردد. نظر به اهمیت و گسترش جهانی بیماری نکروز عصبی ویروسی، این بررسی مروری، اطلاعاتی جدید درباره ویژگی‌های بتانوداویروس، روش‌های انتقال، تشخیص و راه‌های پیشگیری و کنترل آن ارائه کرده است. بنا بر مطالعات اخیر، احتمال حضور بتانوداویروس در آب‌های جنوب ایران و انتقال عفونت آن در ماهیان وحشی و پرورشی مناطق مختلف خلیج فارس مطرح بوده و با توجه به موقعیت خلیج فارس و ارتباط آن با دریاهای آزاد و انتقال این ویروس از طریق آب و ناقلین، امکان انتشار عفونت آن نیز در ماهیان حساس امکان پذیر می‌باشد. از طرفی اندازه کوچک ویروس، سرعت بالای جهش، آلودگی میزبان‌های جدید و مقاوم به ویروس را ممکن می‌سازد و مقاومت بالا و بقای آن در زیست بوم‌های آبی، تهدیدی جدی برای آلودگی و تلفات ماهیان دریایی و پرورشی منطقه محسوب می‌گردد. لذا، جهت پیشگیری از نابودی ذخایر ماهیان حساس در منطقه، مطالعه جامع بیماری، غربالگری گونه‌های مختلف ماهیان حساس به ویروس و شناسایی دقیق و سریع بتانوداویروس، استفاده از واکنش‌های موثر در عرصه پرورش ماهی در قفس، ضرورتی اساسی و اجتناب ناپذیر در کشور به نظر می‌رسد.

**کلمات کلیدی:** ماهی، نکروز عصبی ویروسی، بتانوداویروس، خلیج فارس، ایران

## مقدمه

کشور ایران در سواحل جنوبی، خط ساحلی طولانی مشترک با خلیج فارس به عنوان سومین خلیج بزرگ جهان دارد (Harlioglu and Farhadi, 2017). این خلیج با ویژگی‌های جغرافیایی و اقلیمی خاص، یکی از مناطق مهم و استراتژیک دنیا است (Nematzadeh, 2011). براساس آخرین فهرست تأیید شده، ۹۰۷ گونه ماهی متعلق به ۱۵۷ خانواده را در خود جای داده است (Owfi and Rabbani, 2016). شوری زیاد و دمای بالای خلیج فارس از علل تنوع ماهی‌ها (Nematzadeh, 2011) و سبب رونق صنعت ماهیگیری است به طوری که این صنعت بعد از نفت، دومین منبع طبیعی مهم و تجدیدپذیر منطقه به شمار می‌آید (Harlioglu and Farhadi, 2017; Valinassab et al., 2011)، بخصوص که شرایط آب و هوایی ایران، مناسب برای رشد و تکثیر انواع ماهیان بوده و از این رو آبرزی پروری نقش اساسی در معیشت مردم منطقه بازی می‌کند (Kalbassi et al., 2013).

یکی از بیماری‌های عفونی نوظهور که ماهیان سرتاسر جهان را درگیر نموده و گزارش‌هایی از انتقال افقی و عمودی آن وجود دارد، عفونت بتانوداویروسی است (OIE, 2019) که با توجه به اشتراک ۸۷/۵ درصدی فون ماهیان در خلیج فارس با دریای عربستان و ارتباط خلیج فارس با آب‌های اقیانوس هند از طریق تنگه هرمز و دریای عمان (Nematzadeh, 2011; Owfi and Rabbani, 2016) ماهی‌های دریایی و پرورشی جنوب ایران نیز نمی‌توانند از ابتلا به این عفونت در امان بمانند. بنابراین با توجه به اهمیت ماهیگیری و آبرزی پروری در جنوب ایران و حضور این بیماری ویروسی در آب‌های

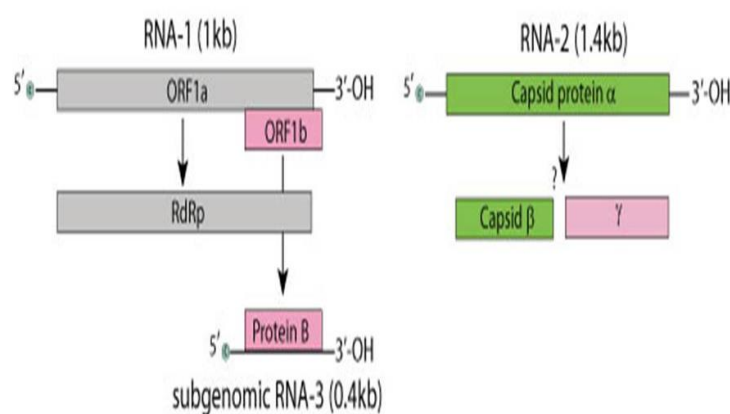
کشورهای همسایه و از همه مهم تر انتقال افقی و عمودی ویروس، احتمال وجود این بیماری در ماهیان جنوب ایران نیز وجود داشته و به عنوان تهدیدی جدی برای صنعت ماهیگیری، پرورش ماهیان دریایی و آبرزی پروری منطقه مطرح می‌باشد، لذا شناسایی ابعاد گوناگون ویروس و مطالعات اکو-اپیدمیولوژیکی مورد نظر در خصوص این بیماری جهان گستر، در منطقه حائز اهمیت استراتژیک می‌باشد.

## ۱-ریخت شناسی، خصوصیات ساختاری و رده بندی بتانوداویروس‌ها

بتانوداویروس یک ویروس بدون پوشینه بیست وجهی است (شکل ۱) که ژنوم آن متشکل از دو مولکول RNA سنس مثبت تک رشته ای (Doan et al., 2016) و فاقد توالی poly A در انتهای ۳ است (De La Pena et al., 2011). توالی RNA1 در حدود (۳/۱ کیلوباز) و شامل یک ORF کدکننده RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) به وزن ۱۱۰ کیلودالتون است که نقش حیاتی در همانند سازی ویروس بازی می‌کند و پروتئین A نیز نامیده می‌شود. توالی RNA2 (۱/۴ کیلوباز) یک پروتئین کپسید به وزن ۴۲ کیلودالتون (پروتئین آلفا) را کد می‌کند. به علاوه اینکه در طول تکثیر ویروس، یک RNA کوچک از ناحیه 3 انتهایی RNA1 ساخته شده و RNA3 (۰/۴ کیلوباز) نامگذاری می‌شود (OIE, 2019; Toubanaki et al., 2015; Valore et al., 2015). این قطعه ۳۷۰ جفت باز می‌باشد و با ORF رپلیکاز در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۷۳۰ و ۳۱۰۰ هم پوشانی داشته (Martinez, 2015) و کدکننده دو پروتئین غیرساختاری به نام B1 (۱۱۱ آمینواسید) و B2 (۷۵ آمینواسید) می‌باشد.

سلولی باشد (Doan *et al.*, 2016; Low *et al.*, 2017).  
B2 برای تکثیر و ایجاد عفونت هر دو آلفانوداویروس و  
بتانوداویروس‌ها نقش اساسی بر عهده دارد (Mézeth *et al.*, 2009).

B1 افزایش خصوصیات ضدنکروتیک (مرگ سلولی)  
سلول میزبان را به همراه دارد، در حالی که B2 به عنوان  
یک پروتئین مهار کننده قوی iRNA میزبان مطرح می-  
باشد و همچنین در توسعه قطعات میتوکندری و مرگ  
سلولی به واسطه تولید پراکسید هیدروژن دخالت دارد.  
پیش بینی می‌شود که پروتئین B2 یک فاکتور مرگ



شکل ۱: قطعات ژنومی بتانوداویروس

Encephalopathy and Retinopathy (Munday *et al.*,  
2002, OIE, 2019)  
بتانوداویروس با آنالیز فیلوژنتیکی RNA2 ناحیه متغیر  
T4، به ۴ گونه مختلف شامل SJNNV، BFNNV،  
TPNNV، RGNNV طبقه بندی می‌شود (OIE, 2019).  
در نروژ یک ژنوتیپ جدید به نام TNV نیز توسط  
Johansen و همکاران (۲۰۰۲) جداسازی شده که وجود  
آن با مطالعات دیگر تأیید نشد (Johansen *et al.*, 2004; )  
(Korsnes, 2008). اما به تازگی ذکر شده است که علاوه  
بر چهار ژنوتایپ اصلی معرفی شده توسط کمیته بین  
المللی طبقه بندی ویروس‌ها، سه ژنوتایپ اضافی تحت  
عنوان TNV، ACNNV، KSNNV ارائه شده است که  
TNV به طور گسترده به عنوان ژنوتیپ پنجم پذیرفته

([WWW.expasy.org/viralzone](http://WWW.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute )  
(of Bioinformatic Viral zone)

بتانوداویروس متعلق به خانواده Nodaviridae و دارای  
سه جنس شناخته شده شامل آلفانوداویروس (آلوده کننده  
حشرات)، بتانوداویروس (آلوده کننده ماهیان) و  
گامانوداویروس (آلوده کننده میگوهای آب شور و  
شیرین) می‌باشد (Doen *et al.*, 2016; NaveenKumar  
*et al.*, 2017). این بیماری به نام‌های زیر نیز نامگذاری  
شده است:

Sea bass Viral Encephalitis (Bellance and :SVE  
Viral Nervous Necrosis Gallet, 1988); VNN  
(Yoshikoshi and Inoue, 1990); FVE: Fish Viral  
Encephalitis (Comps *et al.*, 1994); VER: Viral

همچون سی باس اروپایی و آسیایی شناخته شد ( Bandin and Souto, 2020).

VNN هر دو گروه ماهیان دریایی و پرورشی را تحت تأثیر قرار می دهد و تاکنون حداقل ۱۲۰ گونه متعلق به ۳۰ خانواده از ۱۱ رده ماهیان دریایی، پرورشی و ماهیان آب شیرین مناطق جغرافیائی مختلف به جز قاره آمریکای جنوبی تحت تأثیر این عامل ویروسی قرار گرفته اند (Costa and Thompson, 2016; Curtis et al., 2001; Doan et al., 2016). هرچند در سال های اخیر در ماهیان وارداتی سالم مناطق آمازون نیز تشخیص داده شده است (Martinez, 2015).

در ایران نیز این بیماری در سال ۱۳۸۳ برای اولین بار در کفال ماهیان دریای خزر شناسایی شد (شکل ۲) (Zorriehzahra et al., 2005) و با تلفات زیادی در ماهیان شمال ایران (Ghasemi et al., 2013; Ghiasi et al., 2016; Nazari et al., 2014; Zorriehzahra et al., 2013a) همراه بود و رد پای آن در ماهی های آب های جنوب ایران نیز بررسی شده است (Koohkan et al., 2014).

اکثر میزبان های حساس، ماهیان دریایی هستند و گونه های اندکی که به دلیل فقدان علائم بالینی، به ویروس VNN در نظر گرفته می شوند، شامل موارد ذیل هستند:

- Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*–Yellowtail amberjack (*Seriola lalandi*)
- Red sea bream (*Pagrus major*)
- Rabbit fish (*Siganus guttatus*)

شده، اگرچه هنوز هیچ جدایه ای از آن به دست نیامده است. ACNNV و KSNNV نیز در ژنوتایپ BFNNV قرار می گیرند (Bandin and Souto, 2020).

ژنوتایپ های یاد شده، متناسب با دمای رشد و نوع میزبان است. ژنوتایپ RGNNV بدلیل تنوع میزبانی خود، فراوان ترین ژنوتیب در ماهیان آب های گرم است (رشد بهینه ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد) و در گونه هایی مانند *Dicentrarchus labrax*، *Lates calcarifer* و *Epinephelus* ایجاد می گردند. در حالی که BFNNV محدود به ماهیان دریایی آب های سرد (رشد بهینه ۲۰-۱۵ درجه سانتی گراد) و ژنوتایپ SJNNV نیز با تأثیر بر گونه های پرورشی در ژاپن (رشد بهینه ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) معرفی شد و بعدها در ماهی های اروپایی نیز یافت گردید. TPNNV فقط گونه *Tigger puffer* را در دمای متوسط ۲۰ درجه سانتی گراد آلوده می کند (Doan et al., 2016; Low et al., 2017; OIE, 2019). بتانوداویروس در محیط آبی شور و شیرین تا ۶ ماه باقی می ماند (Frerichs et al., 2000) و با قرار گرفتن در محیط خشکی (حدود ۷ روز در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد) بیش از ۹۹٪ ساختار آن غیرفعال می گردد (Maltese and Bovo, 2007).

## ۲-۵-۱۵-۲ میزبانی

بتانوداویروس اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ در استرالیا و کارائیب توصیف شد و از آن زمان به بعد باعث مرگ و میر و خسارات جدی اقتصادی در انواع مختلف ماهیان سرتاسر جهان شده است. اولین نوداویروس ماهیان در گونه *Striped jack* مشخص شد و پس از آن نیز به عنوان عوامل ایجاد کننده بیماری VNN در سایر گونه های ماهی

ایجاد میزبان‌های جدید برای این بیماری همچنان وجود دارد (OIE, 2019).

### ۳- پراکنش جغرافیایی

این بیماری به طور رسمی در سرتاسر جهان بجز قاره آمریکای جنوبی (Doan et al., 2016) گزارش شده است که شامل کشورهایی در آسیای جنوب شرقی (هند، اندونزی، چین، ژاپن، کره، مالزی، فلیپین، تایلند، ویتنام)، اقیانوسیه (استرالیا، تاهیتی)، مدیترانه (فرانسه، یونان، فلسطین، ایتالیا، جزیره مالت، پرتغال، اسپانیا، تونس)، انگلستان، نروژ، جزایر دریای کارائیب و آمریکای شمالی (USA و کانادا) می‌شود (OIE, 2019). اگر چه تاکنون این ویروس در آمریکای جنوبی جداسازی نشده است ولی در ماهیان وارداتی سالم مناطق آمازون نیز تشخیص داده شده است (Martinez, 2015). وجود این بیماری در کفال ماهیان دریای خزر در دو گونه (*Chelon aurata*) و (*Chelon saliens*) نیز به اثبات رسیده است (Zorriehzahra et al., 2005, 2020).

Goldfinned barb (*Puntius sachsii*) -  
-Bronze coridora (*Corydoras aeneus*)

Sailfin catfish (*Liposarcus multiradiatus*) -  
-Neon tetra (*Paracheirodon innesi*)

حتی گونه‌هایی همچون Zebrafish و Goldfish که از ابتدا به عنوان گونه‌های مقاوم به VNN در نظر گرفته می‌شدند (Furusawa et al., 2007)، با شیوع VNN در سال‌های اخیر تحت تأثیر این ویروس قرار گرفته‌اند (Binesh, 2013; Martinez, 2015; Zorriehzahra et al., 2020).

بیماری با بالاترین شدت در ماهیانی همچون European sea ، Striped jack، Flat fish، Groupers bass گزارش شده است. فهرست گونه‌های ماهیان زینتی آب شیرین حساس به این عفونت، نیز در حال افزایش است (Malteze and Bovo, 2007). در آینده نیز، با معرفی گونه‌های جدیدتر به صنعت آبی پروری، امکان



شکل ۲: پراکنش جغرافیایی ژنوتایپ‌های مختلف بنانودا ویروس (<http://smart.servier.com>)

#### ۴- چگونگی انتقال ویروس به میزبان و ناقلین

محققان معتقدند که بتانوداویروس یک عامل بیماریزای متمایل به بافت عصبی و شبکه چشم است و احتمالاً بافت پوششی بینی، راه ورود ویروس و عصب بویایی مسیر انتقال آن به مغز، شبکه چشم، طناب نخاعی است (Costa and Tompson, 2016; Martinez, 2015). همچنین بافت پوششی لوله گوارش، مکان اصلی برای تکثیر اولیه ویروس می باشد که در نتیجه تماس مستقیم با آب و غذای آلوده، ویروس وارد بدن شده و می تواند به مغز و شبکه چشم (به عنوان بافت هدف) برسد (Grotmol et al., 1999; Malteze and Bovo, 2007; Munday, 1992). انتقال ویروس از طریق آکسون عصبی حسی یا حرکتی به سیستم عصبی مرکزی (CNS) نیز گزارش شده است (Nguyen et al., 1996)، هرچند شواهدی از حضور ویروس در این مکان ها یافت نشده است. از سوی دیگر حضور آنتی ژن ویروس در گنادها، روده، کلیه و کبد نیز گزارش شده است (Johnsen et al., 2002; Nguyen et al., 1997). انتقال عمودی ویروس اولین بار توسط Breuli و همکاران (۱۹۹۱) در Sea bass و همچنین توسط Arimoto و همکاران (۱۹۹۲) در Striped jack مطرح شد (Arimoto et al., 1992; Breuli et al., 1991). روش های معمول این نوع انتقال عبارتند از: انتقال والدی VNN از طریق تخم ها و جنین ماهی آلوده در درون آب (Azad et al., 2006a; Kuo et al., 2012) وجود ویروس در تخمدان، اسپرم، تخم های بارور شده و لاروهای تازه از تخم بیرون آمده، گنادها، کبد، کلیه، معده، روده نیز انتقال عمودی ویروس را مطرح نموده است (Costa and Tompson, 2016) البته لازم به ذکر است که امکان انتقال عمودی

در همه گونه های حساس به VNN وجود ندارد (Martinez, 2015).

روش های انتقال افقی ویروس نیز عبارتند از: آب پیرامون یک جمعیت آلوده یا عفونی (Hick et al., 1997; Le Breton et al., 2011)، بهره گیری از اسکوئید و ماهیان عفونی تحت بالینی به عنوان غذای آزیان (Gomez et al., 2010)، ماهیان خام عفونی جهت تغذیه مولدین (OIE, 2019)، استفاده از بقایای ماهیان وحشی در سیستم آبی پروری به شکل غذا (De La Pena et al., 2011)، پرندگان ماهی خوار (Kou et al., 2012)، ماهیان مهاجر دریایی (De La Pena et al., 2011)، آب در حال گردش اطراف بدن ماهیان آلوده به ویروس (Arimoto et al., 1993)، بی مهرگان وحشی و پرورشی از قبیل صدف های دوکفه ای و حلزون ها (Gomez et al., 2008; Panzarin et al., 2012)، آرتمیا، روتیفر و میگو نیز که به عنوان منبع تغذیه ای مهم لارو ماهیان در محیط دریایی و ناقلین ویروس در دسترس هستند (Skliris and Richards, 1998). همچنین لارو برخی ماهیان مبتلا به VNN توانایی حفظ عفونت و انتقال افقی و عمودی ویروس به نسل های بعدی را دارند (Nerland et al., 2007).

از طرف دیگر آب به عنوان مهم ترین ناقل غیر زنده (Abiotic) ویروس در نظر گرفته شده و در روند یک شیوع بالینی در مزارع پرورشی می تواند از طریق آب و یا تجهیزات ماهیگیری منتقل گردد (Mori et al., 1998). همچنین در دریای آزاد، انتقال عفونت توسط جریانات غالب آبی، قایق ها و نیز مهاجرت ماهیان وحشی صورت می گیرد. به دلیل مقاومت بالای ویروس به شرایط اسیدی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پرندگان ماهیخوار به عنوان ناقل مناسبی مطرح می باشند

گزارش شد (Koohkan *et al.*, 2014). علائم بالینی در مراحل حاد و مزمن بیماری، وابسته به تکثیر ویروس و آزادسازی آن در طول چرخه زندگی می‌باشد (Low *et al.*, 2017). با توجه به اینکه بتانوداویروس یک عامل نوروپاتولوژیکی است، علائم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی همچون رفتارهای شنای غیرمعمول (ماریچی، چرخشی یا خوابیده بر آب با شکمی متورم) و علائم نورولوژیکی دیگر مثل شنای چرخشی و ناگهانی یا التهاب کیسه شنا، آگروفتمالی، تیرگی پوست و بیحالی، لاغری مفرط و تغییر رنگ بدن همراه است (شکل ۳ و ۴)

(Adachi *et al.*, 2008; Low *et al.*, 2017; Martineze, 2015; Nagasawa and Cruz-Lacierda, 2004; OIE, 2019; Shetty *et al.*, 2012; Zorriehzaha *et al.*, 2012)

اکثر ضایعات جدی در مراحل لاروی و جوانی و در مناطق وسیعی از CNS مشاهده می‌گردد (Glazebrook *et al.*, 1990). همچنین در طول عفونت بتانوداویروس، واکوئولاسیون و نکروز بافتی در سیستم عصبی مرکزی و مخچه مشاهده شده است (Malteze and Bovo, 2007). واکوئولاسیون درون و برون سلولی در قسمت عقبی مغز و در لایه‌های گرانولار عمقی شبکه چشم به وفور دیده شده است (Galeotti *et al.*, 1999). آثار پیکنوزیس و افزایش بازوفیل در گانگلیای نخاعی نیز مشاهده شده است (Yoshikoshi and Inoune, 1990). فرآیندهای التهابی و حضور ماکروفاژها (Koohkan *et al.*, 2014; Malteze and Bovo, 2007) و واکوئولاسیون و نکروز بافتی در ماده خاکستری مغز نیز گزارش شده است (Azad *et al.*, 2006b; Koohkan *et al.*, 2014).

(Frerichs *et al.*, 2000). از طرف دیگر به دلیل گستردگی تجارت، بایستی توجه خاصی به نرمتان برگرفته شده از مناطق آلوده شود. اخیراً ویروس از کرم‌های ماسه‌ای خانواده Nereide در نزدیکی یک مزرعه آلوده شناسایی شد. در عرصه تجارت بین‌المللی گسترده، کرم‌ها نیز به عنوان یک خطر بالقوه گسترش بتانوداویروس از منطقه‌ای به منطقه‌ای دیگر، باید مورد توجه لازم قرار گیرند (OIE, 2019).

### ۵- مکانیسم بیماری زایی

شرط لازم ویروس برای ورود به سلول‌های میزبان و ایجاد یک عفونت مؤثر، اتصال ویروس به سلول‌های حساس است. محققین معتقدند که اتصال به اسید سیالیک سطح سلول میزبان و ورود از طریق اندوسیتوز انجام می‌شود (Liu *et al.*, 2005). این ویروس تا قبل از آزادسازی RNA ژنومی خود، درون وزیکول‌های درون سیتوزولی سالم باقی می‌ماند. ویروس تحویل داده شده به سلول، مواد ژنی خود را آزاد می‌کند ولی مسیر و مکانیسم آزادسازی مواد ژنی بتانوداویروس‌های بدون پوشینه از اندوزوم هنوز ناشناخته باقی مانده است (Goldfarb *et al.*, 2006). اخیراً یافته‌های دیگری حاکی از درگیری پروتئین شوک حرارتی (Hsc70) در اتصال بتانوداویروس به سلول میزبان ارائه شده است (Chang and Chi, 2015). Hsc70 به عنوان گیرنده سطح سلول برای اتصال و ورود VNN مورد نیاز است (Chen *et al.*, 2015).

### ۶- علائم بالینی

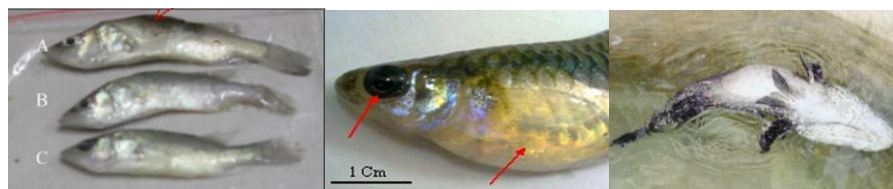
مرگ و میر شدید و نکروز بافت چشم و مغز ماهیان مید (Liza Klunzingeri) و وجود احتمالی بیماری ناشی از بتانوداویروس در مبتلایان به عفونت این ویروس برای نخستین بار در خلیج فارس و دریای عمان



(ب)

(الف)

شکل ۳: وضعیت ظاهری و داخلی کفال ماهیان؛ (الف): کفال ماهیان دریای خزر مبتلا به عفونت بتانوداویروس؛ (ب): بروز اتساع ناحیه بطنی ناشی از تجمع گاز در کیسه شنا (Zorriehzahra *et al.*, 2012)



(ج)

(ب)

(الف)

شکل ۴: علائم بالینی ماهیان آلوده به بتانوداویروس؛ (الف): شنای چرخشی (Nagasawa and Cruz-Lacierda, 2004)؛ (ب): بادکردگی محوطه شکمی و اگروفتالمی (Zorriehzahra *et al.*, 2012)؛ (ج): لاغری مفرط و تغییر رنگ بدن (Shetty *et al.*, 2012)

ماهیان و سائز تور به کار رفته در سیستم پرورشی و مسیر تلقیح تحت شرایط آزمایشگاهی (Peducasse *et al.*, 1999) می‌تواند بیماریزایی عفونت VNN را تحت تأثیر قرار دهد. به خوبی ثابت شده است که تغییرات بوجود آمده توسط اکوسیستم، بر اپیدمیولوژی بیماری‌های عفونی حیوانات وحشی و پرورشی و همچنین بر آبی پروری تأثیر می‌گذارد. در همین راستا تعداد زیادی گونه-های بدون علامت وحشی آلوده به NNV در کشورهای آسیایی و مدیترانه‌ای وجود داشته که افزایش سریع بار ویروسی و متعاقب آن افزایش دمای آب از ۱۶ تا ۲۲

## ۷- عوامل مستعد کننده بروز بیماری

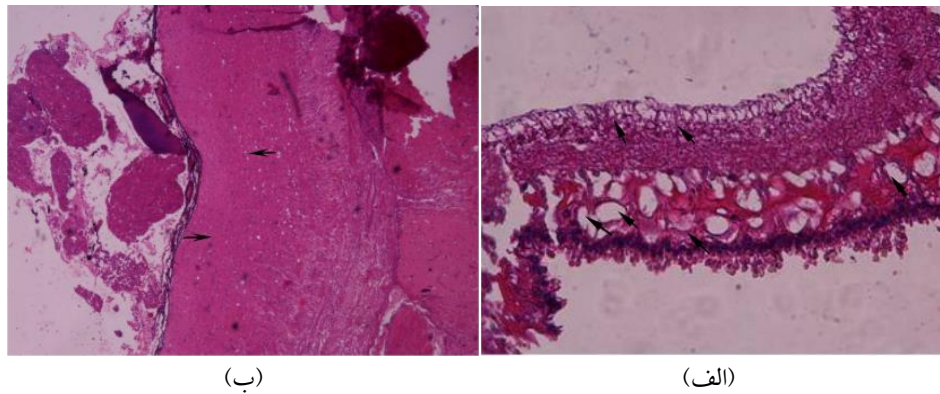
عفونت VNN در اشکال مختلف و از یک شکل تحت بالینی تا یک عفونت حاد و با ۱۰۰ درصد مرگ و میر ظاهر می‌گردد. عوامل مختلفی همچون گونه‌های میزبان، تفاوت ژنتیکی میان سویه‌های ویروسی و حدت آنها (Vendramin *et al.*, 2013) بروز عفونت همزمان با دیگر عوامل عفونی در میزبان (Kokowa *et al.*, 2008)، دوز ویروس (Tanaka *et al.*, 1998)، سن و اندازه در برخی گونه ماهیان (OIE, 2019)، عوامل محیطی همچون دمای آب (Iwamoto *et al.*, 2000)، فاکتورهای استرس آور از قبیل: تراکم، رژیم غذایی

مشاهده واکوتلاسیون بافتی (شکل ۵)، حضور ویروس با مشاهده مقاطع بافتی با میکروسکوپ الکترونی (TEM)، روش ایمونوهیستوشیمی (IHCT) (شکل ۶)، روش پادتن های درخشان غیرمستقیم (IFAT) (شکل ۷)، روش های مولکولی همچون RT-PCR، RT-Nested PCR، RT-PCR و روش کشت سلولی (شکل ۸) (Moody and Crane, 2014).

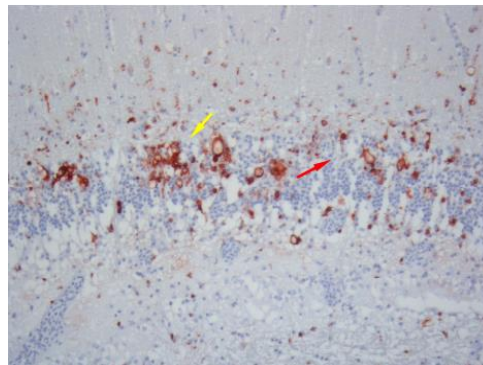
درجه سانتی گراد، سبب شیوع مرگ و میر در آنها شده است (Bandin and Souto, 2020).

### ۸- روش های تشخیص بافتی، مولکولی و کشت سلولی

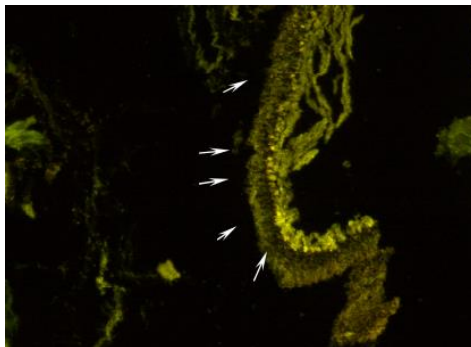
روش های تشخیص ویروس در بافت های عصبی مغز، طناب نخاعی و شبکه چشم شامل موارد ذیل است: تهیه مقطع بافتی و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ئوزین و



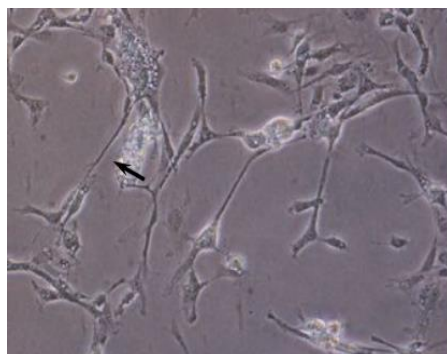
شکل ۵: روش آسیب شناسی و مشاهده واکوتلاسیون بافتی؛ (الف): واکوتلاسیون بافت چشم؛ (ب): واکوتلاسیون بافت مغز (Zorriehzahra et al., 2013b)



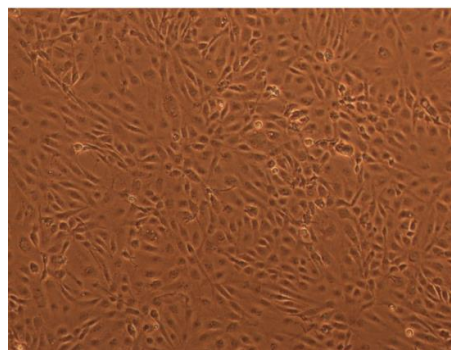
شکل ۶: روش ایمونوهیستوشیمی و وجود رنگدانه های قرمز قهوه ای نشانگر وجود ویروس (Maltese and Bovo., 2007)



شکل ۷: روش IFAT و وجود نقاط براق به عنوان آنتی ژن‌های بتانودا ویروس (Zorriehzahra et al., 2013a)



(ب)



(الف)

شکل ۸: روش کشت سلولی و مشاهده CPE؛ (الف): تیره سلولی SSN1 بدون تلقیح ویروس؛ (ب): تیره سلولی SSN1 با تلقیح ویروس و مشاهده CPE (Zorriehzahra et al., 2013b)

غیرفعال سازی ویروس به روش فیزیکی از طریق حرارت ۶۰ درجه برای ۳۰ دقیقه و در معرض قرارگیری با UV $\mu$ w440 برای ده دقیقه و غیر فعال سازی شیمیایی می‌تواند با سدیم کلرید (۵۰ ppm) به مدت ده دقیقه، ازن ( $0/3\text{mg.CL}_2.1^{-1}$ ) برای ۶ دقیقه و اتانول ۶۰٪ انجام شود. ویروس به فرمالین، کلروفرم و اتر مقاوم است و قادر به مقاومت در شرایط pH حدود ۲ تا ۱۱ به مدت ۲۴ ساعت و با حفظ عفونت زائی خود می‌باشد (Arimoto *et al.*, 1996).

در مجموع ضد عفونی‌های معمول از قبیل سدیم هیپوکلراید، کلسیم هیپوکلراید، آیوداین، هیدروژن پراکسید و بنزالکونیوم کلراید برای غیرفعال سازی ویروس خیلی مفیدند در حالی که فرمالین، اتر، اتانول، متانول، کلروفرم در غیرفعالسازی ویروس نقش بسزایی ندارند (Frerichs *et al.*, 2000). ازن نیز برای جلوگیری یا کاهش آلودگی ویروس روی سطح پوست تخم مورد استفاده قرار گرفته است (Grotmol and Totland, 2000). از طرفی آب آلوده شده با ویروس با در معرض قرارگیری با UV به طور موثری سترون می‌گردد (Frerichs *et al.*, 2000; OIE, 2019). برخی استراتژی‌های موجود جهت کنترل ویروس عبارتند از: غربالگری جنین‌ها، غربالگری آب و تخم‌ها (Kai and Chi, 2008)، اجرای اصول ایمنی زیستی (Martinez, 2015)، شستشو و ضدعفونی لاروها و تخم‌های بارور شده با ازن یا کلر، انجام واکسیناسیون (OIE, 2019).

DNA واکسن‌ها نیز بدلیل حفظ ساختار اصلی پروتئین توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارند. با توجه به اینکه گاهی اوقات ماهی همزمان می‌تواند با بیش از یک ژنوتایپ آلوده گردد و هیچ واکنش ایمنی میان

در مجموع باید ذکر شود که RT-PCR سریع‌ترین و در دسترس‌ترین روش تشخیص ویروس در ماهیان مبتلا با علائم بالینی است. Nested PCR و Real-time PCR نیز روش مفیدی جهت شناسایی ویروس در ماهیان عفونی در شکل تحت بالینی (ماهیان ناقل) هستند. با این حال، جداسازی ویروس با کشت سلولی به دنبال Immunostaining و تشخیص مولکولی، هنوز به عنوان Gold standard ویروس محسوب می‌گردد (OIE, 2003). تعداد کمی تیره‌های سلولی (Cell line) قابلیت جداسازی بتانوداویروس‌ها را دارند. دو مورد از پرکاربردترین cell line ها برای جداسازی بتانوداویروس‌ها که از طریق مجموعه کشت‌های سلولی اروپا (ECACC) در دسترس هستند، تیره سلولی SSN-1 مشتق شده از Striped snakehead (Frerichs *et al.*, 1996) و تیره سلولی E11 مشتق شده از خود SSN-1 می‌باشند (Iwamoto *et al.*, 2000).

#### ۹- بقای ویروس در محیط

بتانوداویروس در محیط آبی بسیار مقاوم است و می‌تواند بیش از ۶ ماه در آب شیرین و ۶ ماه در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد آب دریا پایدار بماند (Frerichs *et al.*, 2000) در حالی که در ۲۵ درجه سانتی گراد یا بالاتر، میزان بقا به طور چشمگیری تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به دنبال شیوع بیماری VNN، آلودگی محیط دریایی با حضور طولانی مدت ویروس و به عنوان وجود یک منبع عفونت برای گونه‌های وحشی حساس، امکان پذیر است. بتانوداویروس در خارج از محیط آبی، بیماریزائی سلولی خود را به آسانی از دست می‌دهد و در شرایط خشکی اکثر ساختارهای آن غیرفعال می‌شود (Maltese and Bovo, 2007).

#### ۱۰- کنترل، پیشگیری و درمان

می توان احتمال وجود این بیماری در آب‌های جنوب ایران و راه‌های انتقال ویروس را مورد بحث و بررسی قرار داد.

با توجه به نیمه بسته بودن خلیج فارس و همجواری با دریای عمان و ارتباط با اقیانوس هند (Owfi *et al.*, 2016) و دریاهای آزاد و اینکه مهم‌ترین راه انتقال ویروس‌های دریایی از طریق آب است، امکان عفونت و ابتلای ماهیان دریائی خلیج فارس بسیار است، از طرف دیگر احتمال انتقال بیماری از منطقه‌ای به منطقه دیگر از راه انتقال افقی و عمودی ویروس عامل بیماری وجود دارد (Kim *et al.*, 2016; OIE, 2019). مهاجرت ماهیان وحشی، پرنندگان مهاجر ماهیخوار، جریان‌ات آبی، همچنین عواملی از جمله انتقال آب توازی کشتی‌ها، همگی ترکیب جوامع ویروسی محیط‌های دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Kim *et al.*, 2016).

گزارش مرگ و میر ماهیان Grouper به دلیل بیماری VNN در کویت (در سال ۲۰۰۸) نیز احتمال آلودگی این ماهیان را در آب‌های جنوب کشور تقویت نمود و در سال ۲۰۱۱ با مشاهده علائم مشابه و مرگ و میر ماهیان آکواریوم دریایی در اطراف تجهیزات مرکز تحقیقات (KISER) کویت به دلیل بیماری VNN تأیید شد (Azad *et al.*, 2014).

همچنین متعاقب مشاهده مرگ و میر شدید ماهیان خلیج فارس و دریای عمان به دنبال وقوع حادثه کشند قرمز، برخی ماهیان مید (*Liza klunzingeri*) تلف شده در منطقه جمع‌آوری و مورد بررسی‌های تشخیصی قرار گرفتند. مشاهده واکوتولاسیون بافت‌های مغز و شبکه چشم ماهیان و احتمال ابتلای آن‌ها به VNN گزارش

آن‌ها ظاهر نمی‌شود، واکسن‌های چندگانه برای حمایت ماهی از ژنوتیپ‌های مختلف ویروسی توصیه می‌گردد (Costa and Tompson, 2016). استفاده از پیتدهای ضد میکروبی (AMP) در تحریک پاسخ ایمنی میزبان به عنوان یک روش درمانی ماهیان آلوده پیشنهاد شده است (Wang *et al.*, 2015). تمرکز روی درمان توسعه یافته برای تحریک سیستم ایمنی ذاتی ماهی، انجام شده است. استفاده از پیتدهای ضد میکروبی (AMP) heptacidin-1 و epinedicin-1 برای بقای بیشتر در برابر عفونت VNN فراهم شده است (Martinez, 2015).

### جمع بندی نهائی و ارائه پیشنهادات

کاهش صید در ایران و کشورهای مجاور همچون کویت و امارات متحده عربی سبب ایجاد یک خلا میان عرضه و تقاضای ماهی شده و پیش‌بینی می‌شود که این خلا به علت کاهش ذخایر ماهیان طبیعی گسترش یابد (Azad *et al.*, 2014). در نتیجه آبی‌پروری سهم بسزایی را طی دو تا سه دهه اخیر در تامین منابع پروتئین حیوانی برای انسان‌ها پیدا کند (NSB, 2008).

در این راستا وجود بیماری VNN در سرتاسر جهان بجز قاره آمریکای جنوبی و گزارشات متعدد وجود این بیماری ویروسی در گونه‌های مختلف ماهیان، به عنوان یک تهدید جدی در صنعت ماهیگیری، پرورش ماهیان دریائی و آبی‌پروری جهان مورد توجه قرار دارد (OIE, 2019).

با وجود شواهدی از آلودگی ماهیان مناطق مختلف جهان و تأکید بر آب‌های جنوب ایران همچون استان هرمزگان (بندر عباس) (Koohkan *et al.*, 2014) و کشورهای همجوار از قبیل کویت (Azad *et al.*, 2014) بحرین (NaveenKumar *et al.*, 2017) و هند

بتانوداویروس در ماهیان وحشی و پرورش یافته در آب‌های جنوب ایران و تائید آن با توالی یابی ژنوتایپ RGNNV بوده است (Ziarati *et al.*, 2020).

علاوه بر این، بررسی‌های انجام شده در مناطق مختلف جغرافیایی سال‌های اخیر نشان داده است که ژنوتایپ RGNNV بطور گسترده ای نه تنها در مزارع پرورش ماهی بلکه در بین ماهیان وحشی حوضه مدیترانه و در سواحل آسیا و استرالیا گسترش یافته است (Bandin and Souto, 2020).

با مطالعه مقالات سایر محققین و جداسازی ویروس در آب‌های خلیج فارس، امکان انتقال ویروس از خلیج فارس تا اقیانوس هند و سایر آب‌های آزاد منطقه وجود دارد. لازم به ذکر است که بتانوداویروس یک ویروس کوچک با ژنوم RNA قطعه قطعه و سرعت جهش بسیار بالاست. اتفاقات reassortant منحصر به ویروس های RNA دار قطعه قطعه است که چنین ژنومی ویروس را جهت تسریع مکانیسم تکاملی و عفونی کردن میزبان‌های جدید و همچنین مهار پاسخ ایمنی میزبان مهیا می‌کند و مشخص شده که reassortant ویروسی مسبب ایجاد علائم شدیدتر و گاه مرگ و میر بالای ماهیان می‌شود (Costa and Tompson, 2016). از طرف دیگر مقاومت بالای ویروس در محیط دریایی و انتقال آن، بتانوداویروس را به عنوان یک تهدید مهم در جمعیت ماهیان دریایی و پرورشی تلقی کرده است (NaveenKumar *et al.*, 2017; OIE, 2019).

بنابراین به منظور پیشگیری از نابودی ذخایر ماهیان منطقه و قبل از بروز همه گیری های گسترده، نیاز مبرم به غربالگری گونه‌های مختلف ماهیان حساس به ویروس و شناسایی بتانوداویروس‌ها وجود دارد. لذا به دستگاه‌های مسئول در کشور پیشنهاد می‌گردد که:

گردید (Koohkan *et al.*, 2014) ولی از آنجایی که هیچ گونه آزمایشات مولکولی و کشت سلولی انجام پذیرفت، وجود این بیماری تائید نشد. واکوئولاسیون بافت های مغز و شبکیه چشم ماهیان Sea bass دریایی و پرورشی در هند، قبلا توسط Azad و همکاران برای اولین بار گزارش شده بود و توسط RT-PCR نیز تائید شد (Azad *et al.*, 2005, 2006a, 2006b). به دنبال شیوع بیماری در ماهیان Sea bass پرورش یافته در قفس از سواحل غربی هندوستان، ماهیان با علائم بیماری مورد آزمایشات مولکولی قرار گرفتند و با روش Nested PCR و توالی یابی محصولات واکنش، وجود بیماری VNN تائید شد (Banerjee *et al.*, 2014). گزارش های اخیر نیز از وجود ویروس در ماهیان Sea bream (Sobaity) پرورشی در آب‌های خلیج فارس منطقه بحرین در دسترس است که مطالعات آسیب شناسی و مرگ و میر ناشی از VNN در سنین مختلف، واکوئولاسیون و تخریب بافت های مغزی و چشمی را در آنها مشخص نموده است و این اولین گزارش VNN و عفونت آن در ماهیان Sea (Sobaity) bream در منطقه بحرین بوده است که با روش‌های مولکولی Nested PCR و Real-time PCR تائید شد (NaveenKumar *et al.*, 2017). به دنبال اتفاقات و گزارش‌های دریافتی چند سال اخیر در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان، فرضیه حضور بتانوداویروس در آب‌های جنوب ایران مطرح و نمونه گیری تصادفی از ماهیان Sea bass وارداتی پرورش یافته در قفس و همچنین ماهیان هامور دریایی و پرورشی جنوب کشور انجام شد و برای اولین بار جداسازی و تشخیص ویروس با روش‌های مولکولی و در نهایت توالی یابی انجام گرفت. این اولین گزارش از جداسازی مولکولی

2. 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.
3. Arimoto, M., Maruyama, K., Furusawa, I., 1993. Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in Striped Jack, Fish Pathology, 29, 19-24.
4. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. Furusawa, I., 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Aquaculture, 143, 15-22.
5. Azad, I.S., Shekhar, M.S., Thirunavukkarasu, A.R., Poornima, M., Kailasam, M., Rajan, J.J.S., Ali, S.A., Mathew Abraham, Ravichandran, P., 2005. Nodavirus infection causes mass mortalities in hatchery produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer*, Bloch: first report from India, Diseases of Aquatic Organisms, 63, 113-118.
6. Azad, I.S., Jithendran, K.P., Shekhar, M.S., Thirunavukkarasu, A.R., de la Pena, L.D., 2006a. Immunolocalization of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch)—a case study, Aquaculture, 255, 39-47.
7. Azad, I.S., Shekhar, M.S., Thirunavukkarasu, A.R. and 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.
8. Azad, I.S., K. Al-Abdul Elah., 2014. VNN: A Challenge to Mariculture in the Arabian Region with a Special Reference to Kuwait, East Asia Conference (Vietnam).
9. 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 Disease, 25(4), 425-429.
10. Bandin, I., Souto, S., 2020. Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review, Pathogens, 9(106), 1-49.

- این بیماری نوظهور مهم و جهان گستر (Worldwide) نیز در فهرست بیماری‌های قابل پیگیری قرار گرفته و برنامه‌های پایش و مراقبت (Monitoring and Surveillance) بتانوداویروس بویژه در آب‌های جنوب لحاظ گردد.

- مطالعات و بررسی‌های اکو-اپیدمیولوژیکی و ژنوتیپیکی بتانوداویروس در آب‌های جنوب ایران با مشارکت محققین انجام گردد.

- موسسات پژوهشی در کشورهای حوزه خلیج فارس در برنامه‌های تحقیقاتی فشرده مشترک منطقه‌ای، در قالب تحقیقات بین المللی با مشارکت سازمان‌های بین المللی همچون OIE و NACA برای توسعه آبی پروری هم افزایی و مشارکت یابند.

- انجام پژوهش‌های کاربردی شایسته به منظور دستیابی به دانش فنی ساخت واکسن‌های مناسب و موثر در منطقه جنوب با عنایت به ژنوتایپ‌های موجود و مطالعات فیلوژنیکی

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب سپاسگزاری خود را از کلیه کسانی که در انجام رساندن و تحقق این بررسی مشارکت و همکاری داشته‌اند بخصوص معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور اعلام می‌دارند.

### منابع

1. Adachi, K., Ichinose, T., Watanabe, K., Kitazato, K., Kobayashi, N., 2008. Potential for the replication of the betanodavirus red spotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines, Archive Virology, 153(1), 15-24.

- aquaculture: a review, *Journal of Fish Diseases*, 40 (5), 717-742.
21. Frerichs, G.N., Rodger, H.D., Peric, Z., 1996. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Journal of General Virology*, 77, 2067-2071.
  22. Frerichs, G.N., Tweedie, A., Starkey, W.G., Richards, R.H., 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus, *Aquaculture*, 185, 13-24.
  23. Furusawa, R., Okinaka, Y., Uematsu, K., Nakai, T., 2007. Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus, *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 119-125.
  24. Galeotti, M., Beraldo, P., Patarnello, P., Sarli, G., Volpatti, D., 1999. Encefalopatia-retinopatia virale (VER-VNN) in giovanili di branzino (*Dicentrarchus labrax*) in assenza di lesioni tipiche di vacuolizzazione cellulare, *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 27, 45-56.
  25. Ghasemi, M., Zorriehzaha, M.J., Sharifpour, E., Haghghi Karsidani, S., 2013. Detection of betanodavirus antigen associated with viral nervous necrosis (VNN) in tissue sections of apparently healthy golden grey mullets, *Liza auratus*, by histopathology examination and indirect fluorescent antibody test (IFAT), *Journal of Aquaculture Development*, 7(3), 53-61.
  26. Ghiasi, M., Binaii, M., Ghasemi, M., Fazli, H., Zorriehzaha, M.J., 2016. Haemato-biochemical disorders associated with nodavirus like-agent in adult leaping mullet *Liza saliens* (Risso, 1810) in the Caspian Sea, *VirusDisease*, 27(1), 12-18.
  27. Glazebrook, J.S., Heasman, M.P., De Beer, S.W., 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), *Journal of Fish Diseases*, 13, 245-249.
  28. Goldfarb, S.B., Kashlan, O.B., Watkins, J.N., Suaud, L., Yan, W., Kleyman, T.R., Rubenstein, R.C., 2006. Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels, *Proceedings of*
  11. Bellance, R., Gallet, D., 1988. L'encephalite virale loup mer Caraibes *Med*, 2, 105-144.
  12. Binesh, C., 2013. Mortality due to viral nervous necrosis in zebrafish *Danio rerio* and goldfish *Carassius auratus*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 104, 257-260.
  13. Breuil, G., Bonami, J.R., Pepin, J.F., Pichot, Y., 1991. Viral infection (picornalike virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles, *Aquaculture*, 97, 109-116.
  14. Chang, J.S., Chi, S.C., 2015. GHSC70 is involved in the cellular entry of nervous necrosis virus, *Journal of Virology*, 89, 61-70.
  15. Chen, N.C., Yoshimura, M., Guan, H.H., Wang, T.Y., Misumi, Y., Lin, C.C., Tsukihara, T., 2015. Crystal structures of a piscine betanodavirus: Mechanisms of capsid assembly and viral infection, *PLoS Pathogen*, 11, e1005203.
  16. Comps, M., Pepin, J.F., Bonami, J.R., 1994. Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture*, 123, 1-10.
  17. Costa, J.Z., Thompson, K.D., 2016. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy, *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 35-49.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Doan, Q.K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., Allal, F., 2016. Viral encephalopathy and retinopathy in

- Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy, *Journal of Fish Diseases*, 27, 327-341.
38. Kai, Y.H., Chi, Sh. Ch., 2008. Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization, *Vaccine*, 26, 1450-1457.
39. Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E., Salari-Joo, H., 2013. A Review on Aquaculture Development in Iran, *ECOPERSIA*, 1(2), 159-178.
40. Kim, Y., Aw, T.G., Rose, J.B., 2016. Transporting Ocean Viromes: Invasion of the Aquatic Biosphere. *PLOS ONE*, 1-18.
41. Koohkan, O., Abdi, R., Zorriehzadra, S.J., Movahedinia, A., Sharifpour, I., 2014. Acute mortality of *Liza klunzingeri* in Persian Gulf and Oman Sea associated with nervous necrosis, *Comparative Clinical Pathology*, 23(2), 367-370.
42. Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2008. A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN), *Aquaculture*, 284, 41-45.
43. Korsnes, K., 2008. Nervous necrosis virus (NNV) in farmed Norwegian fish species. The thesis of the degree Philosophiae Doctor (PhD), Department of Molecular Biology, Bergen University.
44. Kuo, H.C., Wang, T.Y., Hsu, H.H., Chen, P.P., Lee, S.H., Chen, Y.M., Tsai, 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.
45. 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.
46. Liu, W., Hsu, C.H., Hong, Y.R., Wu, S.C., Wang, C.H., Wu, Y.M., Chao, C.B., Lin, C.S., 2005. Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus, *Journal of general virology*, 86, 2553-2561.
- the National Academy of Sciences, 103, 5817-5822.
29. Gomez, D.K., Baeck, G.W., Kim, J.H., Choresca, C.H., Park, S.C., 2008. Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 197-202.
30. Gomez, D.K., Mori, K., Okinaka, Y., Nakai, T., Park, S.C., 2010. Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish, *Aquaculture*, 302, 158-163.
31. Grotmol, S., Bergh, Ø., Gk, T., 1999. Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection, *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(2), 95-106.
32. Grotmol, S. & Totland, G.K., 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae, *Diseases of Aquatic Organisms*, 39, 89-96.
33. Harlioglu, M.M., Farhadi, A., 2017. Iranian Fisheries Status: An Update (2004-2014), *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8(1), 1-9.
34. 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.
35. Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., Furusawa, I., 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses, *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 81-89.
36. Johansen, R., Ranheim, T., Hansen, M., Taksdai, T., Totland, G., 2002. Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus, *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 161-169.
37. Johansen, R., Rove, S., Svendsen, N.A.K., Modahl, I., Dannevig, B., 2004. A sequential study of pathological findings in

- S.S., 2014. Pathogenicity of viral nervous necrosis virus for Guppy fish, *Poecilia reticulata*, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13(1), 168-17.
58. Nerland, A.H., Skaar, C., Eriksen, T.B., Bleie, H., 2007. Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae, Diseases of Aquatic Organisms, 73(3), 201-5.
59. Nematzadeh, M., 2011. The Phylogeny study of Mullet species of Iranian waters by PCR-Sequencing molecular method using mtDNA molecule marker, Master's thesis of Aquaculture, Faculty of Fisheries, University of Agricultural and Natural Resources of Sari, 1-20. (In Persian)
60. Nguyen, H.D., Nakai, T., Muroga, K., 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae, Diseases of Aquatic Organisms, 24, 99-105.
61. Nguyen, H.D., Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K., 1997. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack, Diseases of Aquatic Organisms, 28, 87-91.
62. National Statistics Bureau., 2008. China statistic yearbook 2007. Beijing: China Statistic Press.
63. Owfi, F., Fatemi, M.R., Rabhaniha, M., Coad, B., 2016. Eco-biological characteristics and Zoo-geography of the Persian Gulf fish species. 3<sup>rd</sup> International Conference on The Persian Gulf Oceanography. 27-28 February, Tehran.
64. Owfi, F., Rabhani, M., 2016. Classification of Nutrition and Biogeography of Persian Gulf Fisheries. Second National Conference on Fisheries Research. (In Persian)
65. OIE., 2003. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.
66. OIE., 2019. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. CHAPTER 2.3.12. VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY.
67. Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E.C. Cattoli, G., 2012.
47. Low, C.F., Syarul Nataqain, B., Chee, H.Y., Rozaini, M.Z.H., Najiah, M., 2017. Betanodavirus: Dissection of the viral life cycle: REVIEW. Journal of Fish Diseases, 40(11):1489-1496
48. Maltese, Ch., Bovo, G., 2007. Viral encephalopathy and retinopathy, ITTIOPATOLOGIA, 4, 93-146.
49. Martinez, D.J., 2015. Epidemiology and pathogenesis of Nervous Necrosis Virus. The thesis of the degree Philosophiae Doctor (PhD). Farm Animal and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney.
50. Mézeth, K.B., Patel, S., Henriksen, H., Szilvay, A.M., Nerland., A.H., 2009. B2 protein from betanodavirus is expressed in recently infected but not in chronically infected fish, Diseases of Aquatic Organisms, 83, 97-103.
51. Moody, N.J.G., Crane, M.St.J., 2014. Betanodavirus Infections of Finfish., Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure, 25.
52. Mori, K., Mushiake, K., Arimoto, M., 1998. Control measures for viral nervous necrosis in striped jack, Fish Pathology, 33, 443-444.
53. Munday, B.L., Langdon, J.S., Hyatt, A., Humphrey, J.D., 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), Aquaculture, 103, 197-211.
54. Munday, B.L., Kwang, J., Moody, N., 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review, Journal of Fish Diseases, 25, 127-142.
55. Nagasawa, K and E.R. Cruz-Lacierda (eds.), 2004. Diseases of cultured groupers. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Iloilo, Philippines, 81.
56. NaveenKumar, S., Hassan, M.A., Mahmoud, M.A., Al-Ansari, A., Al-Shwared, W.K., 2017. Betanodavirus infection in reared marine fishes along the Arabian Gulf, Aquaculture International, 25, 1543-1554.
57. Nazari, A., Hassan, M.D., Bovo, G., Zorriehzahra, M.J., Azmi, T.I., Arshad,

- endangered species?. BMC Veterinary Research, 9, 20.
76. ViralZone. Available from [WWW.expasy.org/viralzone](http://WWW.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics.
77. Wang, Y.D., Rajanbabu, V., Chen, J.Y., 2015. Transcriptome analysis of medaka following epinecidin-1 and TH1-5 treatment of NNV infection, Fish and Shellfish Immunology, 42, 121-131.
78. Yoshikoshi, K and Inoue, K., 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Opleanathus fasciatus* (Temminck & Schlegel), Journal of Fish Diseases, 13, 69-77.
79. Ziarati, M., Zorriehzahra, M.J., Kafilzadeh, F., Kargar, M. 2020. Molecular Monitoring and Phylogenetic Analysis of Betanodavirus in Groupers (*Epinephelus spp.*) and Asian Sea bass (*Lates calcarifer*) of Iranian Northern Waters of the Persian Gulf. Current Microbiology, 77(12), 3919-3926.
80. Zorriehzahra, M.J., Nakai, T., Sharifpour, I., Gomez, D.K., Shau-Chi, C., Soltani, M., Saidi, A.A., 2005. Mortality of wild golden grey mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea associated with viral nervous necrosis-Like agent, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 4(2), 43-58.
81. Zorriehzahra, M.J., Ghasemi, M., Koohkan, O., 2012. Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease in Aquatic animals: Past, Present and Future, Journal of Aquaculture Development, 6(1), 19-55. (In Persian).
82. Zorriehzahra M.J., Ghasemi M., Mehrabi M., Kakoolaki Sh., Radkhah K., Nazari A., Rohani M.S., Haghghi Karsidani S., Pakniat Y. and Roustaei E., 2013a. The study on histopathological changes of four Ornamental fish species due to expose of causative virus of Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease, Journal of Aquaculture Development, 7(2), 25-39. (In Persian).
83. Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghghi Karsidani, S., Nazari, A., Sharifpour, I., Rohani, M.S., 2013b. Study of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Caspian Sea grey mullet *Liza auratus* and Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. Infection, Genetics and Evolution, 12, 63-70.
68. Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le ven, A., Baudin Laurencin, F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways, Diseases of Aquatic Organisms, 36, 11-20.
69. Shetty, M., Maiti, B., Santhosh, K.Sh., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., 2012. Betanodavirus of Marine and Freshwater Fish: Distribution, Genomic Organization, Diagnosis and Control Measures, Indian journal of virology, 23(2), 114-123.
70. Skliris, G.P., Richards, R.H., 1998. Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and the rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections, Aquaculture, 169, 133-141.
71. Tanaka, S., Aoki, H., Naka, T., 1998. Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper, Fish Pathology, 33, 31-36.
72. Toubanaki, D.K., Margaroni, M., Karagouni, E., 2015. Development of a Novel Allele-Specific PCR Method for Rapid Assessment of Nervous Necrosis Virus Genotypes, Current Microbiology, 71, 529-539.
73. Valero, Y., Arizcun, M., Esteban, M.A., Bandín, I., Oliveira, J.G., Patel, S., Cuesta, A., Pozo, E.C., 2015. Nodavirus Colonizes and Replicates in the Testis of Gilthead Seabream and European Sea Bass Modulating Its Immune and Reproductive Functions, PLOS ONE, 1-24.
74. Valinassab, T., Jalali, S., Hafezieh, M., Zarshenas, G.A., 2011. Evaluation of some feeding indices of Pomadasys kaakan in the Northern Persian Gulf, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(3), 497-504.
75. Vendramin, N., Patarnello, P., Toffan, A., Panzarin, V., Cappellozza, E., Tedesco, P., Terlizzi, A., Terregino, C., Cattoli, G., 2013. Viral Encephalopathy and Retinopathy in groupers (*Epinephelus spp.*) in southern Italy: a threat for wild

84. Zorriehzahra, M.J., 2020. Viral Nervous Necrosis Disease. In Emerging and Reemerging Viral Pathogens, Academic Press, 673-703.

the evaluation of its infection and a transition probability to other fish (sturgeon, *Rutilus frisi* and cultural fish) in Iran. Final report of a national research project, Iranian Fisheries Research Organization (IFRO), 186.