

"مقاله پژوهشی"

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

مینا زارتی^۱، سید محمد جلیل ذریه زهرا^{۲*}

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۲۰

چکیده

بتانوداویروس یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر ویروسی در ماهیان سرتاسر جهان و مانعی اساسی در گسترش شیلات و آبی‌پروری است. با توجه به افزایش آبی‌پروری 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 آبیان، 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 انجام شده 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 آبی‌پروری 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 آبی‌پروری می‌تواند مورد بهره‌برداری لازم قرار گیرد.

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

در مقاله حاضر، کمک شایانی به حفظ صنعت شیلات و آبریان 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 نمونه برداری 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*) پرورش یافته در قفس جمع آوری شد و به طور مجزا از یکدیگر و با رعایت زنجیره سرد، به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم ارسال گردیدند. در طی نمونه گیری تصادفی، ماهیانی با علائم رفتاری شنای نامتقارن و نشانه‌های ظاهری همچون سرخی چشم و تورم شکمی در اولویت انتخاب بودند (شکل ۱). به محض ورود نمونه‌ها به آزمایشگاه، وزن و طول نمونه‌ها اخذ شد (شکل ۲) و با توجه به نوع آزمایش مورد نظر، کد گذاری و تفکیک انجام گردید.

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 آبریز پروری 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 آبریز پروری 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



شکل ۱: علائم ظاهری ماهیان مبتلا: الف) سرخی چشم ماهی سی‌باس پرورشی، ب) تورم شکمی ماهی هامور وحشی



شکل ۲: اندازه گیری وزن و طول ماهیان

بافت‌های رنگ آمیزی شده 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 شرکت سازنده آن استخراج و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. واکنش Nested PCR در 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 (جدول ۱) (OIE, 2018).

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 به دست 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 آبیگری بافت‌ها در الکل، بلوک‌های پارافینه تهیه و برش با دستگاه میکروتوم (Microm, Germany) انجام شد. در نهایت

جدول ۱: اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Nested PCR

آغازگر	هدف	توالی ۵'-۳'	سایز باند	منابع
F2 R3	RNA2	CGTGTCAAGTCATGTGTCGCT CGAGTCAACACGGGTGAAGA	۴۲۰bp	Nishizowa <i>et al.</i> , 1994
F2' R'2	RNA2	GTTCCCTGTACAACGATTCC GGATTTGACGGGGCTGCTCA	۲۹۴bp	Thiery <i>et al.</i> , 1999b

میکرولیتر، دی‌ان‌تی‌پی میکس 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 جدول ۳ 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 قرار گرفتند (حسن تبار و همکاران، ۱۳۹۷؛ Thiery *et al.*, 1999b).

مرحله اول واکنش با اندک تغییراتی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با محصولات سیناکلون: بافر PCR ۱۰x: ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار: ۰/۷۵ میکرولیتر، دی‌ان‌تی‌پی میکس ۲۰۰ میلی‌مولار: ۰/۵ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، تک دی‌ان‌آ پلیمرز (۵ μ/μ): 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 جدول ۲ اعمال گردید. مرحله دوم Nested-PCR نیز با تغییرات جزئی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با محصولات سیناکلون (بافر PCR ۱x: ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار: ۰/۷۵

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی مرحله اول Nested-PCR

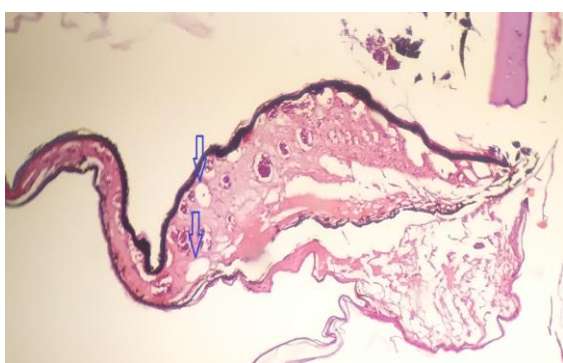
مدت زمان	درجه حرارت (سانتیگراد)	مراحل انجام واکنش
۵ دقیقه	۹۴ درجه	- واسرشت سازی اولیه (جدایی دو رشته DNA)
۳۰ ثانیه	۹۴ درجه	- واسرشت سازی هر رشته
۳۰ ثانیه	۵۵ درجه	- اتصال آغازگر به توالی هدف در DNA
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه	- بسط و ساخت رشته جدید
۵ دقیقه	۷۲ درجه	- تکثیر نهایی

جدول ۳: برنامه دمایی و زمانی مرحله دوم Nested-PCR

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

نتایج

ارایه شده است. نتایج بررسی داده ها و برآورد زمان و هزینه آزمایش های انجام شده در پژوهش حاضر، حاکی از این مطلب بود که روش کیت سریع ایمونوکروماتوگرافی به عنوان سریع ترین و ارزان ترین روش تشخیصی و Nested PCR حساس ترین و اختصاصی ترین روش های این مطالعه معرفی شدند.



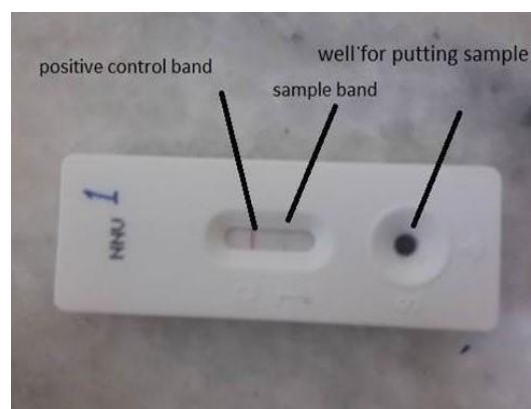
شکل ۴: نمونه واکوتلاسیون بافت شبکیه چشم ماهی سی باس (Ziarati et al., 2020)

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 سانتی گراد قرار داشت. در این بررسی ۲۲٪ از ماهیان مورد آزمون با روش کیت تشخیص سریع ایمونوکروماتوگرافی، مثبت گزارش شدند (شکل ۳).

نمونه های بافتی مورد بررسی به روش آسیب شناسی، واکوتلاسیون و نکروز بافت مغز و چشم ماهیان (شکل ۴) را آشکار نمودند و در نهایت ۲۸٪ از نمونه های مورد بررسی با این روش، مثبت گزارش شدند.

از تعداد نمونه هایی که با Nested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند، حدود ۳۶٪ از نمونه ها، باند ۲۹۴ را آشکار نمودند (شکل ۵). جدول ۴ تعداد ماهیان هر گونه و تعداد و درصد هر روش به تفکیک ذکر شده است.

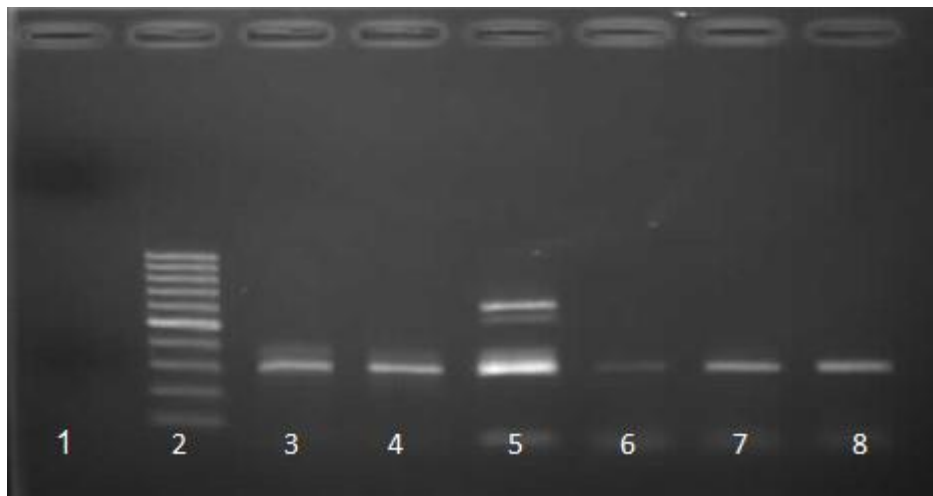
در نهایت پس از انجام آزمایش ها و آنالیز نتایج و مقایسه موارد مثبت شده هر کدام از روش ها، نتایج قابل توجهی به دست آمد که خلاصه ای از آن در جدول ۵



شکل ۳: کیت تشخیص VNN و نمایش نتایج مثبت

جدول ۴: تعداد گونه ماهیان مورد مطالعه، درصد و تعداد موارد مثبت هر گونه به تفکیک روش‌های انجام شده

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



شکل ۵: باند نمونه‌های ارزیابی شده با روش Nested-PCR. از سمت چپ به راست: (۱) کنترل منفی، (۲) Ladder، (۳ تا ۷) نمونه‌های مثبت، (۸) کنترل مثبت

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

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

بحث

در چند دهه اخیر، بروز بیماری و کاهش صید، خلأیی میان عرضه و تقاضای ماهی ایجاد کرده که تهدیدی برای صنعت ماهیگیری و آبروی 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

در چند دهه اخیر، بروز بیماری و کاهش صید، خلأیی میان عرضه و تقاضای ماهی ایجاد کرده که تهدیدی برای صنعت ماهیگیری و آبروی پروری است

(حسن تبار، ۱۳۹۷؛ Fukuda *et al.*, 2006). همچنین Fukuda و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که حساسیت کیت طراحی شده بالاتر از روش آسیب‌شناسی بود و حد تشخیص ویروس ۱۰^۴ 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 می‌باشد (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 علائم 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

لاروی ایجاد می‌کند (Hazreen-Nita *et al.*, 2019) و تشخیص زودهنگام این ویروس می‌تواند خطر تلفات و خسارات اقتصادی ناشی از آن را در تاسیسات پرورش آبیان 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 ۱۰^۳ پارتیکل ویروسی در نمونه، که برای غربالگری اولیه ویروس قبل از شیوع در جمعیت‌های مورد نظر، بسیار مناسب و اقتصادی می‌باشد 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

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 می‌دانند 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 پلیمرز (RT-PCR) و ایمنوهیستوشیمی IHC. 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

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 روش‌های مدنظر در این پژوهش، مشخص شد که روش کیت ایمونوکروماتوگرافی ارزان‌ترین و سریع‌ترین روش تشخیصی است و در عین حال حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به سایر روش‌ها دارد. در مقابل روش آسیب‌شناسی از نظر اختصاصیت و حساسیت تقریباً 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 دستگاه‌های 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 آسیب‌شناسی، نیازمند هزینه، نیروی متخصص و دستگاه‌های پیشرفته است. به طور کلی با توجه به موارد مطرح شده می‌توان اولویت اول را روش‌های مولکولی در نظر گرفت ولی در زمان ضیق وقت و نبود پرسنل ماهر، استفاده از کیت تشخیص سریع بسیار ارزشمند است. همچنین روش آسیب‌شناسی برای تشخیص بتانوداویروس و مشاهده اثرات آن بر بافت میزبان کاربرد دارد ولی زمان بیشتری می‌طلبد. نتایج کنونی در تشخیص بتانوداویروس، Nested-PCR راه اندازی شده را قابل اعتمادتر از دو روش دیگر گزارش نمود و

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 پرورش ماهیان دریایی و آبی‌پروری در آبهای جنوب ایران. توسعه آبی‌پروری، (۲)۱۵، ۶۷-۸۵.
۴. ذریه زهرا، م.ج.، قاسمی، م.، کوهکن، ا.، ۱۳۹۱. بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در آبیان: گذشته، حال، آینده. توسعه آبی‌پروری، ۶(۱)، ۵۵-۱۹.
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 scientifique 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).

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