(مقاله کوتاه)

بررسی احتمال بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (Viral Haemorrhagic Septicaemia) VHS در تعدادی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلای ایران با روش هیستو پاتولوژیکی وآزمایش ملکولی(PCR)

دکتر عادل حقیقی خیابانیان اصل[۱*]، دکتر بهرام کاظمی[۲]، دکتر مژگان بنده پور[۳]

چکیده

به منظور بررسی وضعیت آلودگی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان کشور (ایران) به ویروس عامل بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) از تعدادی مراکز تکثیر و پرورش قزل آلای کشور نمونه گیری بعمل آمد. نمونه‌های اخذ شده شامل بافت‌های کلیه، طحال، کبد، آبشش، قلب، روده و پانکراس بوده که پس از کالبدگشایی ماهیان از بافت‌های هدف یاد شده برای هر دو روش آزمایشی (ملکولی) PCR و پاتولوژی نمونه‌برداری گردید که پس از مقایسه نتایج حاصله از مجموعه کل نمونه‌های ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه به روش PCR ۱۰ مورد مثبت و بقیه منفی بود و در روش پاتولوژی نیز از مجموع کل نمونه ۱۰۰ مرکز مورد مطالعه تعداد ۱۵ مورد نمونه دارای علایم تیپیک پاتولوژیکی بوده و بقیه فاقد علایم پاتوگنومونیک تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه حاکی از پراکنش ویروس عامل بیماری VHS در برخی از مراکز تکثیر و مزارع پرورش قزل آلای کشور بوده و با توجه به نتایج مقایسه‌ای این بررسی لزوم سیاست گذاری نظارت بهداشتی و کنترل و پیشگیری بیماری اجتناب‌ناپذیر است. در نهایت نتیجه اینکه، با توجه به محاسن و اختصاصات ویژه هر کدام یک از روش‌های تشخیصی در این بررسی و مطالعه مقایسه‌ای این دو تکنیک تشخیصی در بیماری ویروسی (VHS) هدف بسیار مناسبی برای ادامهٔ مطالعات بر روی پاتوژنیسیتی (بیماریزایی) و جداسازی ویروس عامل بیماری و تعیین درجه حدّت آن برای اولین بار در ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: سپتی سمی هموراژیک ویروسی، پاتولوژی، پی سی آر دو مرحله‌ای، قزل آلای رنگین کمان، ایران

The study on probable of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in some rainbow trout propagation and breeding by histopathology and molecular techniques in Iran

Haghighi Khiabanian Asl, A.[1*], Kazemi, B.[2], Bandehpour, M.[3]

1-Department of Aquatic Diseases, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran*

2- Department of Parasitology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3-Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

To investigate of the contamination of rainbow trout propagation and breeding centers in Iran to viral haemorrhagic septicemia (VHS tissue samples from liver, kidney, spleen, bronchia, heart, intestine, and pancreas of affected rainbow trout were taken and prepared for both molecular and pathological techniques. Comparison of results showed 15 out of 100 examined samples with the pathology method and 10 out of 100 examined samples with the PCR are positive and the remains are negative with no pathognomonic signs. The obtained results shows that some rainbow trout hatcheries are contaminated in different regions of country, therefore, a definition of prevention, control program and eradication criteria is essential to protect the unaffected areas in the country. The results of this study revealed the high morbidity of VHS virus in some centers of rainbow trout propagation and breeding in the country. In concluding two diagnostic methods, of this study are very useful for virus isolation and it is reported for the first time in Iran.

Keywords: *Viral haemorrhagic septicemia, Pathology, Nested-PCR, Rainbow trout, Iran*

مقدمه

طبق مطالعات صورت گرفته بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) یکی از مشکلات عمده مزارع پرورش

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

۲- دپارتمان انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳ - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

قزل آلا در اروپا می‌باشد(۳). در سال‌های اخیر مواردی مشکوک به این بیماری در مزارع پرورشی ایران نیز مشاهده شده است(۴).

بیماری VHS معمولاً فقط ماهیان پرواری را مبتلا می‌کند(۳و۱۰). قزل آلای رنگین کمان نسبت به این بیماری بسیار حساس است در حالی که قزل آلای قهوه‌ای نسبت به آن مقاومتر می‌باشد. اخیراً بیماری VHS در آزادماهیان پرورشی اقیانوس آرام و نیز در مزارع دریایی پرورش ماهی نیز گزارش شده است. ماهیان مبتلا عموماً بیش از ۵ سانتی متر طول دارند و مهمترین نشانهٔ آن تلفات سنگین است که معمولاً با خونریزی در پوست همراه می‌باشد(۶و۱۰). ماهیان بسیار حساس به شدت تیره می شوند و به سرعت می‌میرند. آبشش این ماهیان رنگ پریده است و لکّه‌های خونریزی قرمزی را نشان می‌دهد. ممکن است در اطراف چشم نیز خونریزی‌هایی مشاهده می‌شود. در کالبدگشایی معمولاً لخته‌های بزرگ خون در چربی‌های بدن، روی غدد تناسلی و درون ماهیچه‌ها دیده می‌شود. کبد بسیار رنگ پریده و تا حدودی زرد رنگ می‌شود و کلیه نازک‌تر و به رنگ قرمز روشن درمی‌آید. پس از تلفات اولیه در یک همه‌گیری که نشان دهندهٔ حالت حاد بیماری است، بیماری به شکل مزمن درمی‌آید. در این حالت، تلفات کاهش می‌یابد و ماهی پس از گذشت مدت طولانی تری می‌میرد(۱، ۱۱ و۱۲). در این شکل، ماهی کاملاً تیره به نظر می‌رسد و بیرون زدگی چشم‌ها را نشان می‌دهد. این ماهیان به واسطه خونریزی شدید داخلی بسیار کم خون هستند که این حالت بویژه در آبشش‌ها و کبد به خوبی مشخص است. کیسه شنا و کلیه ممکن است بزرگ شده یا تمام محوطه شکمی از مایعات پُر شود در این ماهی‌ها حالت ادم به خوبی مشاهده می‌گردد. با پایان گرفتن همه‌گیری، نشانه‌های عصبی در ماهیان مبتلا آغاز می‌شود (۲و۱۱). (فاز تأخیری)، ماهیان مبتلا پیچ و تاب می‌خورند و حرکات معلق‌وار دارند.

وجود خونریزی در سرتاسر اندام‌های داخلی آزادماهیان همیشه زنگ خطری برای امکان وجود بیماری VHS می‌باشد. شیوع بیماری زمانی رخ می دهد که درجهٔ حرارت آب در پایین‌ترین سطح خود قرار دارد ($4^{\circ}C$ تا $14^{\circ}C$ سانتی گراد) اعتقاد بر این است که استفاده از ماهیان دریایی آلوده به بیماری در جیره‌های غذایی تر و تازه سبب انتقال بیماری می‌گردد و این ماهیان نباید مورد استفاده قرار گیرند. گاهی اوقات وجود بیماری در بچه ماهیان انگشت قد در تابستان گزارش شده است، ولی عفونت معمولاً در دمای بالاتر از ۸ درجه سانتی گراد حالت مخفی و نهفته دارد. در این حالت، وقتی دمای آب پایین بیفتد یا ماهیان تحت استرس ناشی از دستکاری قرار گیرند. بیماری دوباره همه‌گیر می‌شود(۱۰).

مواد و روش کار

بهترین پایدارکننده بافتی فرمالین سالین۱۰٪ می باشد. در مرحله آماده نمودن بافت‌ها، قبل از قالب‌گیری بافتی احتیاج به آبگیری و سپس شفاف شدن دارد ، بطوریکه در یکسری الکل اتیلیک با درجات تزایدی از۷۰ ٪ تا الکل مطلق انجام می‌گیرد و نمونه‌ها بایستی به اندازه‌ای باقی بمانند (حداکثر دو ساعت) که برای اشباع شدن کامل لازم است و نگهداری طولانی مدت در الکل‌ها با درجه بالا سبب چروکیدگی و سختی بافت می‌شود و مراحل فوق توسط دستگاه اتوتکنیکون یا دستگاه گردش بافت انجام می‌گیرد و این دستگاه شامل بشرهای الکل اتیلیک و سبدهای فلزی می‌باشد و قبل از شروع کار دستگاه، تنظیم زمان کار دستگاه توسط کاربر صورت می‌گیرد و معمولا بین۲۰ تا ۲۴ ساعت نمونه‌ها در آن قرار داده می‌شود. در مرحله اشباع بافتی به معنی اشباع شدن کامل بافت با ماده‌ای است که نمونه می‌بایست در آن قالب‌گیری شود و در عمل خارج ساختن عامل شفاف کننده (گزیلل) و جایگزینی آن با پارافین

می‌باشد. بهترین دمای پارافین بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. بعد از آماده شدن نمونه ها بهتر است بمدت ۲۴ ساعت در داخل یخچال نگهداری شوند و بعد برش بافتی با میکروتوم به اندازه ۵-۶ میکرون انجام شده و پس از قرار دادن در حمام گرم (بن ماری ۴۵ درجه) مقاطع بریده شده بر روی لام قرار داده می‌شود. روش استاندارد برای رنگ‌آمیزی لام‌ها، روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، ائوزین می‌باشد. و در نهایت چسباندن لامل بر روی لام یا عمل مونته کردن توسط چسب کانادا بالزام صورت می‌گیرد. معمولا در پایان رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، ائوزین هسته سلولها به رنگ آبی و سیتوپلاسم آنها به رنگ قرمز یا صورتی قابل مشاهده می‌باشد(۹).

Nested- PCR

از نمونه بافت مشکوک ارسال شده به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی شهید بهشتی استخراج DNA ویروس عامل بیماری VHS که از گروه ویروس تک رشته‌ای غیرسیگمانته خانواده رابدوویریده می‌باشد به روش فنل کلروفرم انجام شد. ابتدا واکنش RT-PCR با ۱μg RNA, آنزیم 100u mMULV، 0.1mM dNTP، 10pmol پرایمر و 1X بافرRT-PCR در دمای ۴۲ درجه انجام و cDNA حاصل در واکنش Nested-PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت(۸). واکنش PCR در هر دو مرحله با 1X بافر PCR ، dNTP 0.1mM، Mgcl2 1.5mM ، ۱ μg DNA، 20pmol پرایمر اختصاصی ژن و 1unit آنزیم Taq DNA polymerase در واکنش نهایی ۳۰ میکرولیتری انجام گرفت. برنامه PCR در ۳۰ سیکل با دمای annealing ۶۳ درجه در PCR اول و ۵۶ درجه در PCR دوم انجام گرفت. در نهایت پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در دستگاه ژل داکیومنتیشن، حرکت باندهای DNA مربوط به آمپلی‌فای شدن ژن مورد نظر از ژنوم ویروس توسط دستگاه (Transiluminiotor u.v.) با طول موج ۳۲۰ نانومتر (nm) مشاهده و عکسبرداری گردید(۵).

نمونه‌برداری

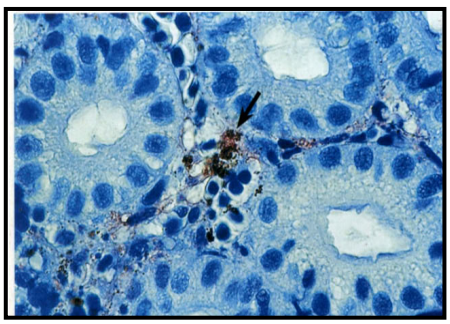
از پاییز سال ۸۳ لغایت پاییز سال ۸۵ از تعداد ۱۰۰ مزرعه پرورش ماهیان سردآبی واقع در ۱۰ استان مهم آبزی پرور کشور نسبت به اخذ نمونه‌های لازم برای هر دو روش آزمایش تشخیصی شامل ماهیان در حال تلفات (Moribund) و دارای علایم بالینی تیپیک و یا موارد تلفات موردی بدون علایم بالینی مشخص اقدام گردید. برای نمونه‌های پاتولوژی از فیکساتیو فرمالین سالین ۱۰٪ و برای نمونه‌های PCR از فیکساتیو اتانول ۲۰٪ استفاده گردید. نمونه‌های پاتولوژی طبق روش استاندارد هیستوتکنیک در پروسهٔ مقطع‌گیری قرار گرفته و با رنگ‌آمیزی (H&E) آماده‌سازی گردید و نمونه‌های اتانول ۲۰٪ نیز حاوی بافت‌های هدف به آزمایشگاه بیوتکنولوژی (مولکولی) ارسال گردید. عمده بافت‌های هدف مورد آزمایش قرار گرفته شامل کلیه قدامی، طحال، کبد، قلب، آبشش، روده و پانکراس و عضله می‌باشد. علایم هیستوپاتولوژیکی مهم شامل نکروز در اندام‌های خونساز مثل کلیه، نکروز و تخریب سلولی در پانکراس، خونریزی‌های شدید و عمقی در عضلات، بافت‌های سروزی کیسه شنا، قلب و کبد به همراه خونریزی‌های نقطه‌ای (پتشی) روی اندام‌های حفره شکمی و نیز هیپرتروفی کلیه و کیسه شنا و ادم شدید در این اندام‌ها می‌باشد(۱۰). از جمله علایم مهم کلینیکی و بالینی هم شامل تورم کلیه، خونریزی‌های شدید کبدی، اگزوفتالمی، پتشی سرتاسری، کم خونی آبشش‌ها، آماس خونی دهانی، ادم ناحیه شکمی (آسیت)، خونریزی‌های نقطه‌ای بر روی بافت چربی احشایی، خونریزی اطراف چشم‌ها، زخم‌های جلدی و تیرگی کلی رنگ بدن می‌باشد(۱۰).

نتایج

از تعداد ۱۰۰ مرکز تکثیر و پرورش ماهی با علایم بالینی و در حال تلف شدن نمونه ها از نظر پاتولوژی وآزمایشات مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند(جدول۱ و نمودار۱). با توجه به الکتروفورز محصول PCR روی آگاروز ۲٪ باند ۵۶۶ bp مربوط به ژن گلیکوپروتئین ویروس IHN می‌باشد (نگاره۲). همچنین در مطالعات بافت‌های پارانشیماتوز بخصوص کلیه، توسط رنگ آمیزی با تکنیک ایمونوپراکسیداز اسی، ویروس لوکالیزه شده در بافت هماتوپوئتیک کلیه مشخص می‌باشد (نگاره۱) و در مقطع هیستو پاتولوژیکی کلیه، نکروز شدید سلولی به همراه هسته‌های تکه‌تکه شده (کاریورکتیک) مشاهده می‌گردد(نگاره۴) (رنگ‌آمیزی (H&E)). در بررسی‌های بالینی و کالبد گشائی نیز عمدتا علائم تیپیک خونریزی در کیسه شنا و چربیهای احشائی در اثر عفونت سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی قابل مشاهده می‌باشد(نگاره۳).

جدول ۱- نتایج نمونه ها و درصد آلودگی آنها

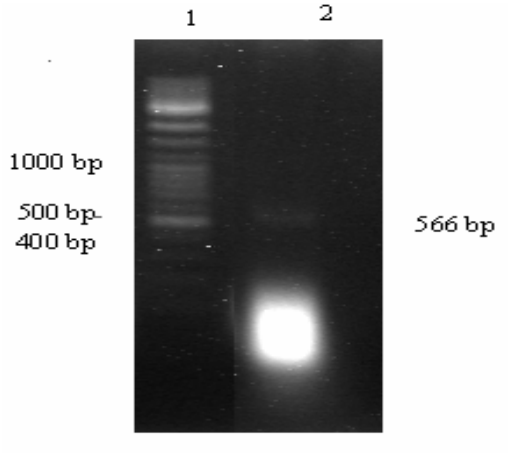
ردیف	استان	پاتولوژی			PCR		
		مراکز تحت بررسی	نمونه های دارای علایم	درصد نمونه های دارای علایم	مراکز تحت بررسی	نمونه های مثبت	درصد آلودگی در سطح مراکز
۱	مازندران	۲۵	۲	٪۸	۲۵	۱	٪۴
۲	گیلان	۹	۲	٪۲۲/۲	۹	۱	٪۱۱/۱
۳	اردبیل	۶	۳	٪۵۰	۶	۱	٪۱۶/۶
۴	لرستان	۸	–	٪۰	۸	–	٪۰
۵	مرکزی	۴	۲	٪۵۰	۴	۲	٪۵۰
۶	خراسان شمالی	۶	۲	٪۳۳/۳	۶	۲	٪۳۳/۳
۷	کردستان	۱۰	۳	٪۳۰	۱۰	۳	٪۳۰
۸	کهگیلویه و بویراحمد	۱۲	۱	٪۸/۳	۱۲	–	٪ ۰
۹	آذربایجان غربی	۸	–	٪۰	۸	–	٪۰
۱۰	اصفهان	۱۲	–	٪۰	۱۲	–	٪۰
میانگین درصد موارد مثبت		۱۰۰	۱۵	۲۰/۱۸	۱۰۰	۱۰	۱۴/۵



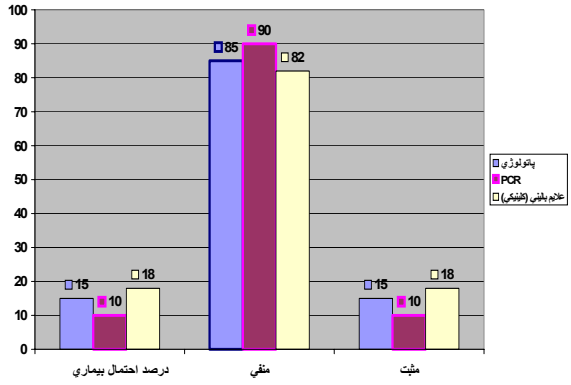
نگاره۱- مقطع هیستوپاتولوژیکی کلیه، رنگ آمیزی توسط تکنیک ایمونوپراکسیداز اسی که نشان دهنده ویروس لوکالیزه شده در بافت هماتوپوئتیک کلیه است.(فلش)

جدول۲- نتایج مثبت و منفی ۱۰۰ مرکز بررسی شده در کشور

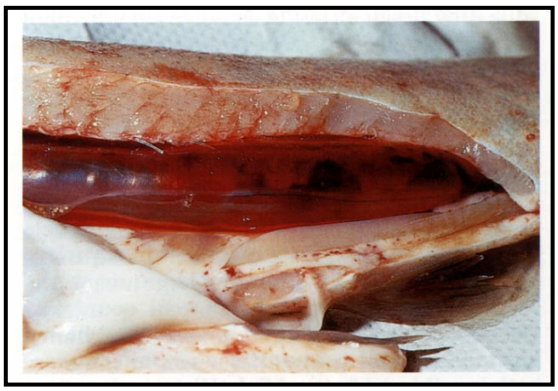
نتایج	مثبت	منفی	درصد احتمال بیماری
پاتولوژی	۱۵	۸۵	۱۵
PCR	۱۰	۹۰	۱۰
علایم بالینی	۱۸	۸۲	۱۸



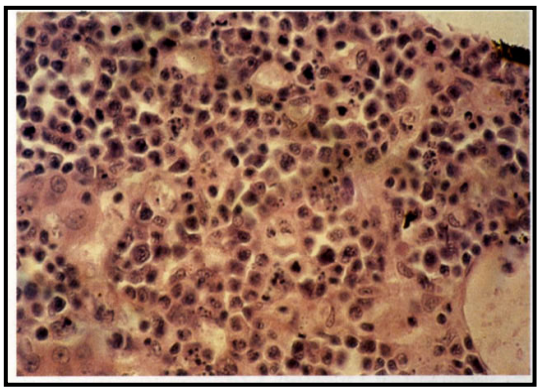
نگاره ۲- الکتروفورز محصول PCR روی آگاروز ۲٪، ستون ۲ محصولPCR مربوط به ژن گلیکوپروتئین ویروس را نشان میدهد



نمودار۱- توزیع آلودگی و مقایسه روشهای تشخیصی



نگاره ۳- کالبدگشائی ماهی آلوده با علائم تیپیک خونریزی در کیسه شنا و چربیهای احشائی در اثر بیماری سپتی سمی خونریزی‌دهنده ویروسی



نگاره ۴- مقطع هیستوپاتولوژیکی کلیه، نکروز شدید سلولی به همراه هسته‌های تکه تکه شده (کاریورکتیک)، (رنگ آمیزی (H&E))

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آلودگی و احتمالاً بروز بیماری VHS در برخی از مزارع پرورش قزل آلای ایران می‌باشد. از تعداد کل نمونه‌های ۱۰۰ مرکز بررسی شده به روش تشخیص پاتولوژیکی، تعداد ۱۵ مورد دارای علایم تیپیک تشخیصی بوده و با روش Nested-PCR با متد طراحی پرایمر اختصاصی بیماری VHS، تعداد ۱۰ مورد مثبت بدست آمد. با توجه به مقایسه نتایج مثبت هر دو مطالعه انجام گرفته علاوه بر این که تأیید تشخیصی بصورت مقایسه‌ای نسبت به همدیگر می‌باشند، نقطهٔ قوتی در امر تشخیص نهایی نیز می‌باشد. البته در کنار روش تشخیص پاتولوژیکی روش دقیق و حساس‌تری همچون PCR می‌تواند بسیار ارزشمند باشد و نیز یافته‌های بالینی با پیش‌بینی بروز تلفات قابل توجه در برخی از مزارع پرورشی نمونه‌برداری شده در درجه حرارت‌های پایین‌تر را تقویت می‌کند. برای رسیدن به این اهداف ابداع روشهای

اختصاصی و حساس برای تشخیص بیماری مانند PCR از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۷). با توجه به اینکه روش‌های تشخیصی نظیر الایزا و ایمونوهیستوشیمی و فلورسنت آنتی بادی درخشان برای بیماری (VHS) کاربرد دارد ولی به لحاظ بروز واکنش‌های متقاطع بین ویروس‌های دیگر با عامل مولد بیماری VHS، احتمال بروز خطا در تفسیر این آزمایش ها وجود دارد، لذا یک روش تشخیص حساس و مطمئن‌تر مثل PCR، جهت مقایسهٔ نتایج روش‌ها مورد نیاز است و ایجاد آزمایشگاه ویروس شناسی جهت مطالعه بیماریزایی و جداسازی ویروس عامل مولد جهت تأیید قطعی بیماری الزامی است تا اولاً ویروس عامل بیماری جداسازی گردیده و ثانیاً درجه حدت آن مطالعه شود (۴ و۷). البته مشخص نمودن مقدار و حدت این آنتی ژن ویروسی (پاتوژن) به عوامل عمده‌ای مثل طول دوره کمون بیماری، مقدار مقاومت ایمنی بدن ماهی، عوامل جانبی استرس زا و عوامل محیطی در ارتباط با فصل، دما، تغییرات pH و نوسانات استرسی وابسته می‌باشد. رعایت دقیق ضوابط بهداشتی و کنترلی بیماری در مراکز تکثیر و پرورش و نیز با اعمال مدیریت‌های قرنطینه‌ای و ایزوله‌سازی ماهی‌های ناسالم و یا دارای رفتارهای غیرعادی از نوع سالم در جلوگیری از شکل گرفتن کانون حاد و شدید بیماری نقش بسزایی دارد. البته یکی از دلایل عمده‌ای که می‌تواند عدم بروز بیماری و تظاهرات بالینی در این مراکز را توجیه نماید، کم حدت بودن سویه ویروسی آلوده کننده نیز می‌باشد. با روش PCR ژنوم ویروس عامل بیماری شناسایی می شود و در صورتی که ویروس در مراحل اولیه تکثیر باشد و یا حتی اگر در اثر ضایعه سلولی، تخریب سلولی نیز صورت گرفته باشد، امکان شناسایی آن وجود دارد البته این امکان نیز وجود دارد که ویروس های باقی مانده، سلول های سالم برای تکثیر در اختیار نداشته باشند و در اثر آنزیم های موجود تخریب شوند و ژنوم آن نیز توسط آنزیم‌های RNase و DNase موجود در محیط از بین رفته و در تست PCR قابل شناسایی نباشد(۴ و۷). بطور کلی نتایج بدست آمده در هر دو روش PCR و تشخیص پاتولوژیکی قابل همخوانی می‌باشند و از تعداد ۱۰۰ نمونه مراکز مورد بررسی، تعداد ۱۸ مورد از آنها علایم کلینیکی منتسب به VHS داشته و تعداد ۱۵ مورد نمونه مثبت با تشخیص علایم پاتولوژیکی و تعداد ۱۰ مورد نمونه مثبت به روش PCR تشخیص داده شده است. بطور کلی در مزارع پرورش ماهیان قزل آلای ایران احتمال وجود بیماری ویروسی سپتی سمی خونریزی دهنده وجود داشته و دو روش PCR و پاتولوژی برای تشخیص بیماری مفید بوده و با یکدیگر همخوانی دارند(۸).

فهرست منابع

1. Ahne, W. and Thomsen, I. (1985): Occurrence of viral hemorrhagic septicemia virus in wild whitefish Coregonus sp. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B. 32:7375.
2. De Kinkelin, P., and Castric., J. (1982): An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry, Salmo salar L., to viral haemorrhagic septicaemia. J. Fish Dis. 5:5765.
3. De Kinkelin, P. (1983): Viral haemorrhagic septicaemia. Pages 5162 *in* D. P. Anderson, M. Dorson, and Ph. Dubourget, eds. Antigens of fish pathogens. Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.
4. Haghighi, A., Soltani, M., Kazemi, B., Sohrabi, I. and Sharifpour, I. (2007): Use of Immunohistochemical and PCR Methods in Diagnosis of Infection Haematopoietic Necrosis Disease in some Rainbow Trout Hatcheries in Iran. Pakistan Journal of Biological Science. 10(2): 230- 234.

5. Kazemi, B., Bandehpour, M., Yahyazadeh, H., Roozbehi, M., Seyed, N., Ghotasloo, A., and Taherpour, A. (2004): Comparative study on HCV detection in Iranian patients by RT– PCR and ELISA techniques during 2001-2003. J. Med. Sci. 4(2): 132- 135.
6. Naca. (1991): Fish health management in Asia-Pacific Report on a Regional study and workshop on fish disease and fish health management ADB Agriculture Department Report series No. Bangkok, Thailand 627. Pp:340-355.
7. OIE/ office International de Epizooties (2006): International aquatic animal Health Code. Fish, mollusks and crustaceans. Fifth edition. Page: 469 notifiable disease chapter 2.1.5. Pp:141-158.
8. Pherson, M.C. and Moller, M.J. (2000): PCR. The Basics from Background to Bench. Bios Scientific publishers. Chapter 2.Undrestanding PCR. Pp: 9-21.
9. Roberts, R.J. (2001): Fish pathology. Bailliere Tindall, London. Pp:238-243 and 386-387.
10. Roberts, R.J. and Shepherd, C.J. (1974): Handbook of Trout and salmon Disease the white friars press Ltd. London and Cambridge. Pp:168.
11. Shuzo, E. (1991): Infectious disease of fish Japonese Transl of sa kana no kansensho., oxonian press pvt, Ltd., New Delhi Pp:696
12. Wolf, K. (1988): Fish viruses and fish viral Disease. Cornell university press, Ithaca, New York. 115-122.