JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره هفدهم، شماره اول، ۱۴۰۰، پیاپی ۴۲: ۶۱-۴۹

مقاله پژوهشی

وقوع بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ در استان‌های چهارمحال و بختیاری، لرستان و اصفهان

مهدی رئیسی*[۱]، کیوان صادقیان[۲]، اردشیر گنجی[۲]، عبدالرسول نامجو[۳]، مظاهر زمانی[۳]، داریوش آزادیخواه[۴]، مهران مهدی پور[۵]

۱. استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری، ایران.

۳. دانشیار گروه آسیب شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۴. استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۵. استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰

چکیده

سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در ماهیان پرورشی محسوب می‌شود، که وقوع آن به‌خصوص در قزل آلای رنگین کمان منجر به تلفات زیادی می‌گردد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی وقوع و تغییرات بافتی بیماری فوق در استان‌های چهارمحال و بختیاری، لرستان و اصفهان از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ است. بر این اساس ماهیان قزل آلای مشکوک دارای علائم بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که از مجموع ۱۵۱۵ نمونه بررسی شده، تعداد ۲۰۲ نمونه (۱۳/۳۳ درصد) به ویروس فوق آلوده بودند. نتایج همچنین حاکی از آلودگی ۱۴/۶۵ درصد نمونه‌ها استان چهارمحال و بختیاری، ۱۵/۱۶ نمونه‌ها در استان لرستان و ۸/۵ درصد نمونه‌ها در استان اصفهان در طول ۵ سال مطالعه است. میزان وقوع بیماری در اوزان مختلف ماهی نیز مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان وقوع بیماری در ماهیان با وزن بیش از ۲۰۰ گرم (۲۲/ ۲۸ درصد) است. این میزان در ماهیان با وزن ۲۰۰-۵۰ گرم ۱۹/۴۴ درصد و در بچه ماهیان با وزن ۵۰-۱ گرم ۸/۶ درصد است. با توجه به این‌که بیماری در طول مطالعه در دامنه سالیانه حدودا ۹ تا ۱۹ درصد نوسان داشته است، کنترل قطعی بیماری نیازمند برنامه‌های مدون در راستای ریشه کنی است.

کلمات کلیدی: سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی، قزل آلای رنگین کمان، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز.

*نویسنده مسئول: مهدی رئیسی

آدرس: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

پست الکترونیک : mehdi.raissy@iaushk.ac.ir

مقدمه

آبزی‌پروری همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های تأمین غذای سالم برای جوامع انسانی مطرح بوده است. در سال‌های اخیر، همگام با افزایش جمعیت جهان و محدودیت ذخایر طبیعی ماهیان، آبزی پروری در کشورهای مختلف توسعه چشمگیری داشته است. توسعه‌ی که متناسب با ظرفیت جغرافیائی و علمی مناطق مختلف هنوز ادامه دارد به‌طوری‌که ماهی در حال حاضر ۲۰-۱۵ درصد پروتئین مصرفی انسان را تشکیل می‌دهد (۸). آمارهای منتشر شده توسط سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد نشان می‌دهد که میزان تولیدات آبزی پروری از ۱۳ میلیون تن در سال ۱۹۹۰ به ۸۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۸ رسیده است و چشم اندازی معادل ۹۳ و ۱۰۹ میلیون تن برای سال‌های ۲۰۲۱ و ۲۰۳۰ دارد (۱۲). این افزایش تولید در ایران و به‌خصوص در پرورش ماهی قزل آلا در مزارع پرورش ماهی نیز مشاهده می‌شود. تولید این ماهی در سال ۱۳۹۷ به بیش از ۱۷۳ هزار تن رسید که ایران را به یکی از کشورهای پیشرو در تولید ماهی قزل آلا در آب شیرین تبدیل کرد (۱۱،۲۵).

سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی یک بیماری بسیار مسری با تلفات زیاد در ماهیان آب شیرین و شور است. عامل این بیماری از جنس نویرابدوویروس و خانواده رابدوویریده است. این ویروس فشنگی شکل بوده و دارای RNA تک رشته‌ای است (۲۱). ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده دارای انتشار جهانی است و تعداد میزبان‌های آن به ۱۴۰ نوع ماهی رسیده است (۸). آزاد ماهیان و به‌خصوص قزل الای رنگین کمان حساس‌ترین میزبان محسوب می‌شوند بطوری‌که بروز بیماری منجر به تلفات حتی تا ۱۰۰ درصد جمعیت و بخصوص در بچه ماهیان می‌شود (۲۹). موارد زیادی از ابتلای گونه‌های مختلف ماهی در نقاط مختلف جهان از جمله ایرلند، ژاپن، اسپانیا، کلمبیا، امریکا، ترکیه، کره و نروژ وجود دارد که با مرگ و میر گسترده ماهیان همراه بوده‌است (۶، ۱۴، ۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). بیماری ممکن است به‌صورت فوق حاد، حاد، مزمن و یا فرم عصبی مشاهده شود. در حالت فوق حاد، ماهیان بخصوص کوچک در مدت کوتاهی تلف می‌شوند. در فرم حاد علائم سپتی سمیک بویژه خونریزی‌های وسیع داخلی در نقاط مختلف بدن مشهود است. چرخش ماهی و عدم تعادل ناشی از تهاجم ویروس به سیستم عصبی مرکزی در اشکال فرم حاد، مزمن و به‌خصوص عصبی گزارش شده است (۲۸،۵).

خیابانیان و همکاران در سال ۱۳۸۷ برای اولین بار در ایران، عامل بیماری را به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز جدا و گزارش کرد (۱۵). وضعیت آلودگی به ویروس فوق در تخم‌های چشم زده ایرانی و خارجی و میزان پراکنش آن در بین مزارع تکثیر استان چهارمحال و بختیاری در مطالعه دیگری مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). نتایج این مطالعه نشان داد که ۰/۸۳ درصد از نمونه‌های اخذ شده به ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده آلوده بودند. نخستین همه‌گیری‌های وسیع بیماری در سال ۱۳۹۲ گزارش شد که با تلفات زیاد و ناگهانی ماهیان همراه بود. عامل تلفات که در ابتدا ناشناخته بود، پس از مدتی توسط سازمان دامپزشکی بعنوان ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده گزارش شد . این بیماری در فهرست بیماری‌های اخطار کردنی سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) قرار دارد (۲۴). علیرغم تلاش‌های گسترده در سه دهه گذشته، بیماری هنوز فاقد واکسن تجاری است و کنترل بیماری عمدتا مبتنی بر اقدامات مدیریتی پیشگیرانه است (۱۰). قرنطینه ماهیان جدید، پایش آلودگی با روشهای مولکولی،

کاهش تردد بین مزارع و حذف ماهیان آلوده از جمله این اقدامات است.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی موارد وقوع بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی در مزارع پرورش ماهیان قزل آلا در برخی استان‌های کشور شامل چهارمحال و بختیاری، لرستان و اصفهان از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ بود.

مواد و روش کار

-نمونه‌ها

به منظور انجام این مطالعه، ۱۵۱۵ گزارش تلفات بیماری در استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان و لرستان از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد مزارع در استان‌های چهارمحال و بختیاری، لرستان و اصفهان بترتیب ۴۱۰، ۴۵۳ و ۱۶ مورد بود. ماهیان دارای علائم بالینی بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی شامل تیرگی رنگ، اگزوفتالمی، علایم عصبی و خونریزی در مطالعه لحاظ شدند. از هر مزرعه، تعداد پنج نمونه از بخش قدامی کلیه، کبد و طحال ۵ قطعه ماهی از هر مزرعه پرورش ماهی جدا و پس از ارسال در شرایط استاندارد در آزمایشگاه بررسی و تشخیص بیماری‌های ماهیان سردابی اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفت.

-تشخیص مولکولی ویروس

جهت استخراج RNA ویروس از کیت RNeasy Mini شرکت QIAGEN آلمان با کد ۷۴۱۰۴ و بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. بمنظور ساخت cDNA، ۵ میکرولیتر از DEPC-water بهمراه ۲ میکرولیتر از RNA و یک میکرولیتر Random Hexamer در یک لوله استریل مخلوط، و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از ۵ دقیقه سرد کردن بر روی یخ، ۵ میکرولیتر M-Mulv RT 5X buffer، دو میکرولیتر dNTP 10 M و یک میکرولیتر از آنزیم M-Mulv RT را به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه گذاری گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master Cycler Gradient (اپندورف آلمان) صورت پذیرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ مشاهده می‌شود (۲۸).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی

نوع پرایمر	توالی پرایمر	نام ژن	کد شناسائی در بانک ژن	دمای ذوب	اندازه باند (bp)
Forward	ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG	ژن N	KM587696.1	۴۸	۵۰۵
Reverse	GCGGTGAAGTGCTGAGTTCCC				

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل وا سرشته شدن اولیه (۱۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلیسیوس)، چرخه سه مرحله‌ای که ۳۵ بار تکرار شد شامل واسرشتگی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، هم سرشتگی یا اتصال پرایمرها به هر رشته به مدت ۱ دقیقه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط اولیه به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در پایان مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (۲۸). نمونه‌های تحت آزمون در کنار نمونه کنترل مثبت موجود در کیت تشخیصی (BioinGentech ساخت شیلی) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز در میدان-الکتریکی ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۱۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۴۰ دقیقه صورت پذیرفت. نمونه ژل سپس در زیر

نـور UV دسـتگاه Gel documentation UVITEC مورد بررسی قرار گرفت.

-تهیه مقاطع آسیب شناسی

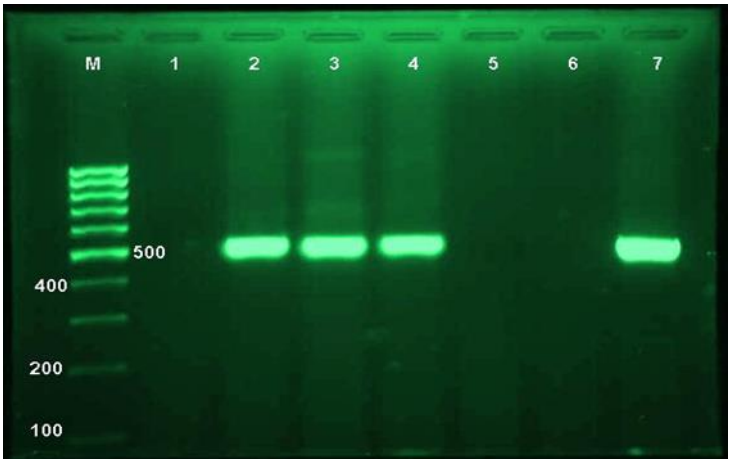
نمونه‌های بـافتی از بخـش قـدامی کلیـه، کبـد، طحـال و عضلات ماهیان بیمار در فرمالین بافر ۱۰ درصد (مـرک، آلمان) قرار داده شد و جهت تهیه مقاطع آسیب شناسـی به آزمایشگاه آسیب شناسی ارسال شد. پـس از مراحـل آبگیری، شفاف سـازی و آغشـتگی بـا پـارافین و قالـب گیـری، بـا میکروتـوم دوار بـرش هـای بـه ضـخامت ۵ میکرون بریده و به روش رایـج هماتوکسـیلین و ائـوزین رنگ آمیزی شد (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از وارد نمودن داده هـا در برنامـه SPSS نسـخه ۲۴، جهـــت ارزیـــابی نرمـــال بـــودن داده هـــا از آزمـــون کولموگراف اسـمیرنوف و شـاپیرویلک اسـتفاده شـد و داده‌ها از توزیع نرمال برخوردا نبودند $p<۰/۰۵$. داده‌هـا پس از توصیف و بیان تعداد، درصد و فراوانی با استفاده از آزمـون‌هـای ناپارامتریـک کروسـکال والـیس و دان مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

بـر اسـاس نتـایج بدسـت آمـده از مجمـوع ۱۵۱۵ نمونـه مشکوک بررسی شده در طول ۵ سال، تعداد ۲۰۲ نمونه (۱۳/۳۳ درصـد) آلـوده و مـابقی سـالم بودنـد. تصـویر الکتروفورز برخی از نمونه‌های بررسی شده در شـکل ۱ نمـایش داده شـده اسـت. نتـایج نشـان داد کـه میـزان آلودگی ۲۷ نمونـه (۱۷/۸۸ درصـد) در سـال ۱۳۹۳، ۳۸ نمونـه (۹/۹۲ درصـد) در سـال ۱۳۹۴، ۳۳ نمونـه (۹/۳۷ درصـد) در سـال ۱۳۹۵، ۶۶ نمونـه (۱۹/۰۲ درصـد) در سال ۱۳۹۶ و ۳۸ نمونـه (۱۳/۵۲ درصـد) در سـال ۱۳۹۷ بوده است (جدول ۲). مقایسه مقادیر حـاکی از افـزایش معنی دار بین میزان وقوع بیمـاری در سـال ۱۳۹۶ نسـبت به سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ می‌باشد ($p<۰/۰۵$).



شکل ۱- تصویر الکتروفورز نمونه‌های مطالعه شده. ستون ۱: نمونه کنترل منفی، ٤-۲ نمونه‌های مثبت. ۵ و ٦: نمونه های منفی. ۷: کنترل مثبت

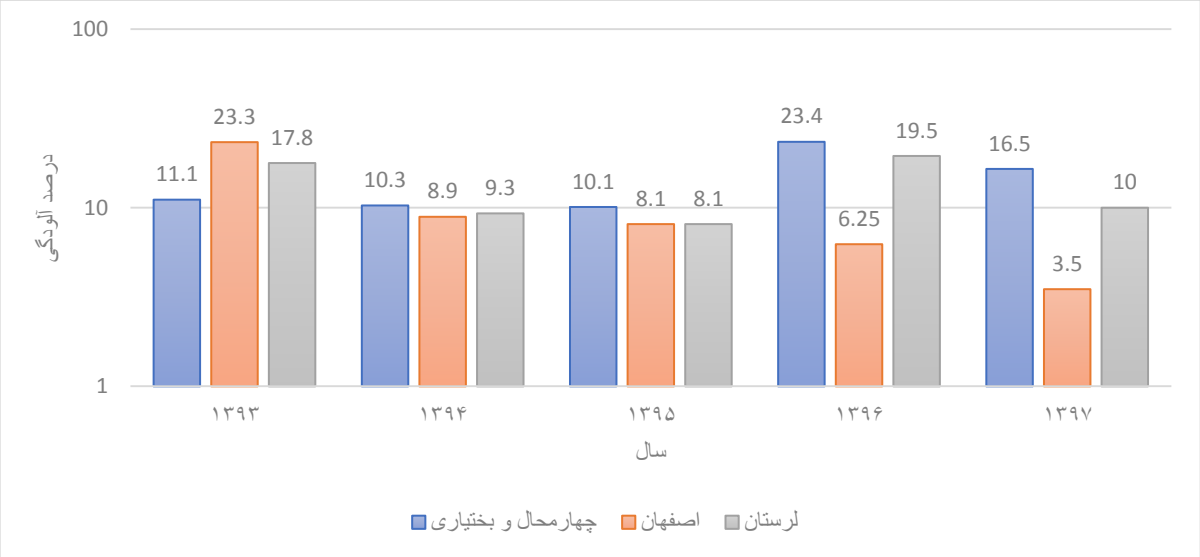
بر اساس اطلاعـات جـدول ۲، میـزان وقـوع بیمـاری در سال‌های مختلف در هـر اسـتان‌هـای متغیـر بـوده اسـت. درصد وقـوع بیمـاری در کـل دوره بررسـی، در مـزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری معادل ۱۴/۶۵ درصد و در استان‌های لرستان و اصفهان بترتیـب ۱۵/۱۶ و ۸/۵ درصد است. شکل ۲ درصد آلودگی به ویروس را در استان‌های مختلف با توجه به سال نشـان مـی‌دهـد. درصـد آلـودگی در سـال‌هـای ۹۳ تـا ۹۷ از حـدود ۳/۵ درصد تا ۲۳/۵ درصد در نوسان بوده است. میزان وقـوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک به تفکیک وزن ماهی نیز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج بیشترین میزان وقـوع بیمـاری در ماهیـان بـا وزن بـیش از ۲۰۰ گـرم

مشاهده شد. بطوری‌که میزان آلودگی در این ماهیان ۲۸/۲۲ درصد بود. این میزان در ماهیان با وزن ۲۰۰-۵۰ گرم ۱۹/۴۴ درصد و در بچه ماهیان با وزن ۵۰-۱ گرم ۸/۶ درصد بود (جدول ۵). مقایسه میانگین آلودگی در اوزان مختلف ماهی اختلاف معنی دار را نشان داد ($p < ۰/۰۵$).مطالعه وقوع فصلی آلودگی نشان داد که میزان آلودگی در سال‌های مختلف الگوی یکسانی ندارد. میانگین آلودگی در فصول بهار تا زمستان به ترتیب ۱۲، ۱۲/۸، ۱۴/۵ و ۱۳/۷ درصد بوده است. البته تعداد نمونه‌های ارجاعی و مشکوک در تابستان کمتر بوده است (جدول ۳).

جدول ۲: میزان وقوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک به تفکیک استان در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۳

استان	سال ۱۳۹۳		سال ۱۳۹٤		سال ۱۳۹۵		سال ۱۳۹۶		سال ۱۳۹۷		کل نمونه‌ها	
	نمونه مثبت	کل نمونه	نمونه مثبت	کل نمونه	نمونه مثبت	کل نمونه	نمونه مثبت	کل نمونه	نمونه مثبت	کل نمونه	نمونه مثبت	کل نمونه
چهارمحال و بختیاری	۱۲	۱۰۸	۲۶	۲۵۱	۲۱	۲۰۶	۵۳	۲۲۶	۳۴	۲۰۵	۱۴۶	۹۹۶
اصفهان	۷	۳۰	۸	۸۹	۷	۸۶	۵	۸۰	۲	۵۶	۲۹	۳۴۱
لرستان	۸	۱۳	۴	۴۳	۵	۶۱	۸	۴۱	۲	۲۰	۲۷	۱۷۸
کل نمونه‌ها	۲۷(۱۷/۸)^{ac}	۱۵۱	۳۸(۹/۹۲)^{ab}	۳۸۳	۳۳(۹/۳۴)^{ab}	۳۵۳	۶۶(۱۹/۰۲)^{dc}	۳۴۷	۳۸(۱۳/۵)^{ac}	۲۸۱	۲۰۲	۱۵۱۵

حروف غیر همسان نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($p<0.05$).



شکل ۲: درصد وقوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک به تفکیک استان‌ها از سال ۱۳۹۷-۱۳۹۳

مطالعه وقوع فصلی آلودگی نشان داد که میزان آلودگی در سال‌های مختلف الگوی یکسانی ندارد. میانگین آلودگی در فصول بهار تا زمستان به ترتیب ۱۲، ۱۲/۸، ۱۴/۵ و ۱۳/۷ درصد بوده است. البته لازم به ذکر است تعداد نمونه‌های ارجاعی و مشکوک در تابستان کمتر بوده است (جدول ۳).

جدول شماره ۳: میزان وقوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک (تعداد نمونه مثبت و کل نمونه) در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۳

ماه	۱۳۹۳		۱۳۹۴		۱۳۹۵		۱۳۹۶		۱۳۹۷		کل نمونه‌ها	
	مثبت	کل	مثبت	کل	مثبت	کل	مثبت	کل	مثبت	کل	مثبت	کل
فروردین	۴	۱۲	۱	۲۹	۲	۲۲	۶	۲۷	۳	۱۹	۱۹	۱۰۹
اردیبهشت	۰	۰	۰	۲۴	۰	۲۶	۷	۵۸	۲	۳۰	۹	۱۳۸
خرداد	۳	۱۵	۲	۳۱	۴	۳۴	۶	۴۵	۲	۱۶	۱۷	۱۴۱
تیر	۰	۰	۰	۱۲	۰	۱۷	۵	۲۶	۲	۱۱	۷	۶۶
مرداد	۰	۰	۴	۱۸	۴	۲۴	۲	۱۲	۰	۱۷	۱۰	۷۱
شهریور	۰	۰	۶	۱۷	۳	۲۱	۱	۱۰	۱	۱۵	۱۱	۶۳
مهر	۲	۱۱	۲	۲۹	۴	۳۰	۸	۲۵	۴	۱۸	۲۰	۱۱۳
آبان	۳	۱۹	۴	۴۷	۴	۲۸	۵	۲۲	۵	۳۳	۲۱	۱۴۹
آذر	۳	۱۹	۷	۵۵	۳	۴۲	۵	۴۰	۵	۳۶	۲۳	۱۹۲
دی	۲	۲۵	۴	۵۲	۵	۳۸	۵	۲۶	۳	۳۰	۱۹	۱۷۱
بهمن	۲	۳۱	۵	۳۷	۲	۲۶	۱۰	۳۰	۶	۳۱	۲۵	۱۵۵
اسفند	۸	۱۹	۳	۳۲	۳	۴۵	۶	۲۶	۵	۲۵	۲۵	۱۴۷

میزان وقوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک به تفکیک وزن ماهی نیز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج بیشترین میزان وقوع بیماری در ماهیان با وزن بیش از ۲۰۰ گرم مشاهده شد. بطوری‌که میزان آلودگی در این ماهیان ۲۸/۲۲ درصد بود. این میزان در ماهیان با وزن ۲۰۰-۵۰ گرم ۱۹/۴۴ درصد و در بچه ماهیان با وزن ۵۰-۱ گرم ۸/۶ درصد بود (جدول ۵). مقایسه میانگین آلودگی در اوزان مختلف ماهی حاکی از اختلاف معنی دار بین ماهیان می‌باشد ($p<0/05$).

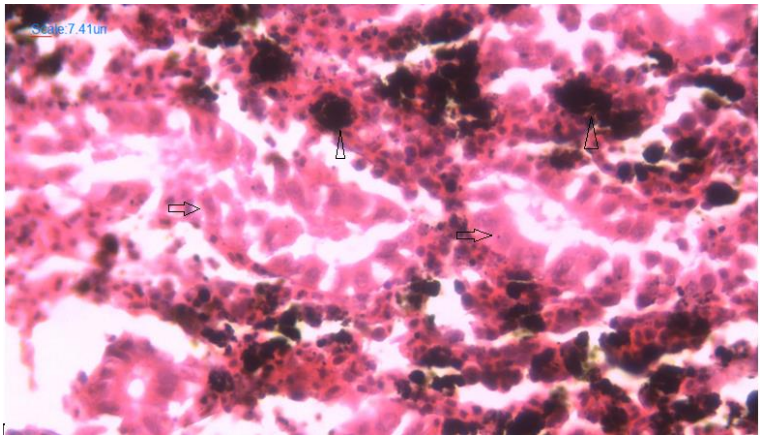
جدول شماره ٤: میزان وقوع بیماری سپتی‌سمی هموراژیک به تفکیک وزن ماهی

وزن ماهی	سال ۱۳۹۳		سال ۱۳۹۴		سال ۱۳۹۵		سال ۱۳۹۶		سال ۱۳۹۷		کل نمونه‌ها	
	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه	نمونه مثبت (٪)	کل نمونه
۱-۵۰ گرم	۱۳(۱۴/۲۸)	۹۱	۱۸(۶/۵۶)	۲۷۴	۱۵(۸/۷۲)	۱۷۲	۲۱(۹/۰۵)	۲۳۲	۱۷(۸/۲۱)	۲۰۷	۸۴(۸/۶۰)a	۹۷۶
۵۰-۲۰۰ گرم	۱۱(۲۷/۵۰)	۴۰	۱۱(۱۶/۹۲)	۶۵	۱۳(۹/۴۸)	۱۳۷	۲۶(۳۰/۹۵)	۸۴	۱۲(۲۴)	۵۰	۷۳(۱۹/۴۱)b	۳۷۶
>۲۰۰ گرم	۳ (۱۵)	۲۰	۹(۲۰/۴۵)	۴۴	۶(۱۳/۶۳)	۴۴	۱۹(۶۱/۲۹)	۳۱	۹(۳۷/۵)	۲۴	۴۶(۲۸/۲۲)c	۱۶۳

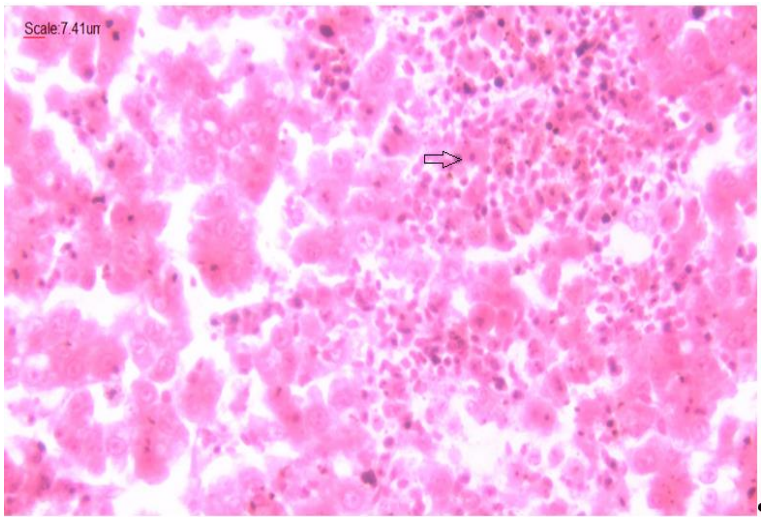
حروف غیر همسان نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($p<0.05$).

تغییرات آسیب شناسی

در بافت کبد، کلیه و طحال افزایش کانون‌های نکروز و تغییرات دژنراتیو شامل واکوئله شدن سیتوپلاسم و تغییرات نکروتیک در هسته سلول‌های تشکیل دهنده بافت شامل، پیکنوز کاریولیز و ائوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم و نفوذ سلول‌های تک هسته‌ای مثل لنفوسیت وپلاسماسل در محل آسیب مشاهده شد. علاوه بر این در کلیه نکروز توبول‌ها به همراه حضور رنگدانه در ماکروفاژها در مرکز کانون‌های خون سازی در بین توبول‌های کلیه مشاهده شد (شکل ۳، ۴).



شکل ۳-کلیه ماهی قزل آلا مبتلا به سپتی‌سمی هموراژیک، با کانون‌های پراکنده نکروز و دژنراسیون (پیکان) و ملانوماکروفاژ با حاشیه مشخص (مثلث) (H&E*400).



شکل ٤- کبد ماهی مبتلا به سپتی‌سمی هموراژیک، کانون‌های نکروز پراکنده (پیکان) (H&E*400).

بحث

اولین گزارش‌های مربوط به بیماری سپتی‌سمی هموراژیک ویروسی قدری همراه با حدس و گمان است ، و به نظر می‌رسد بیماری از مدت‌ها قبل در اروپا وجود داشته و تعدادی از گونه‌های بومی آزاد ماهیان مانند قزل‌آلای خال قرمز (*Salmo trutta fario*)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و ماهی آزاد دانوب (*Hucho hucho*) به بیماری مبتلا شده‌اند (۲۷). این بیماری به طور رسمی در سال ۱۹۳۸ توسط Schaperclaus تحت عنوان تورم کلیه و دژنره شدن کبد از قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شد (۵و ۲۷). Jensen در سال ۱۹۶۳ در کشور دانمارک موفق به جداسازی عامل بیماری سپتی سمی هموراژیک از تخمدان ماهی قزل‌آلای مبتلا شد و ویروس را اگتود نامید. بیماری تا سال ۱۹۸۸ در خارج از قاره اروپا مشاهده نشد، تا این‌که در مایعات تخمدانی گونه قزل آلای جویباری (*Oncorhynchus tshawytscha*) و ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) در امریکا جدا شد (۵، ۱۶).

در ایران بیماری نخستین بار در سال ۱۳۸۶ گزارش شد (۱۳). از سال ۱۳۹۲ همه‌گیری بیماری در ماهیان قزل آلای پرورشی در نقاط مختلف ایران گزارش شده است (۲۳). بیماری سپتی سمی هموراژیک دارای

پراکندگی جهانی است ولی ورود بیماری به ایران بشکل ناگهانی و وسیع بود، و در مدت بسیار کوتاهی تمامی نقاط کشور به ویروس آلوده شد (). عواملی همچون: واردات تخم چشم زده، عدم رعایت شرایط حمل و نقل و قرنطینه، و تراکم زیاد ماهی در استخرهای پرورش موجب گسترش بیماری سپتی سمی هموراژیک در بیشتر نقاط کشور شد (۲۳). آلودگی سطحی تخم با ویروس می‌تواند به گسترش بیماری کمک نماید، بنابراین مولدین و تخم‌های آلوده را می‌توان به عنوان یکی از منابع مهم آلودگی در نظر گرفت. علاوه بر این در بیشتر موارد بیماری در مولدین بدون علامت است و عدم تشخیص بیماری در این گروه از ماهیان موجب شیوع بیماری می شودم (۲۹).

در مطالعات قبلی، ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده از ۵ مورد از مجموع ۱۶ گزارش مرگ و میر ماهیان در ۶ استان کشور در حد فاصل مهر ۱۳۹۳ تا تیر ۱۳۹۴ جدا شد (۱). در سال ۱۳۸۶، ۱۰ نمونه (۱۵) و در سال ۱۳۹۱ نیز یک نمونه آلوده گزارش شده بود (۱۰). مطالعه دیگری حاکی از آلودگی ۱۲/۶ درصد مزارع پرورش قزل الا در کشور دارد. عوامل متعددی بعنوان فاکتورهای مؤثر در وقوع بیماری در این مطالعه بررسی شده‌است، و بر مبنای اطلاعات ثبت شده در سامانه سازمان دامپزشکی کشور، ورود غیر مجاز بچه ماهی به مزرعه، ورود غیرمجاز ماهی بازاری و نوع منبع آب (آب رودخانه) از پارامترهای مهم و تأثیر گذار نام برده شده است (۳).

درمطالعه حاضر روند بیماری در سه سال اول مطالعه کاهشی بوده است و سپس در سال ۱۳۹۶ شاهد افزایش میزان درگیری با بیماری هستیم. بطوری‌که اختلاف معنی داری بین میزان وقوع بیماری در سال ۱۳۹۶ نسبت به سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$) (جدول). قطعاً اقدامات پیشگیرانه انجام شده در سال‌های اول بروز بیماری همانند قرنطینه و خشک کردن مزارع در کاهش بیماری مؤثر بوده است. افزایش بیماری در سال‌های بعد نیز به‌معنی افزایش تلفات ناشی از بیماری نیست بطوریکه مشاهده الگوی تلفات در مزارع پرورش ماهی حاکی از غالب شدن شکل مزمن و یا شکل عصبی بیماری نسبت به فرم حاد است. این الگوی بیماری در برخی مطالعات قره گوزلو و همکاران نیز گزارش شده است (۱۳). نتایج مطالعه آنها نشان داد که الگوی بیماری در سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ از فرم حاد به مزمن درحال تغییر است.

مطالعات همه‌گیری شناسی بیماری در کشورهای دیگر مقادیر متفاوتی از شیوع را نشان می‌دهد. برای مثال در ترکیه ۵ نمونه از مجموع ۵۹۶۷ نمونه ماهیان مطالعه شده و در سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ به بیماری مبتلا بودند (۱۴). در دانمارک نیز تعداد مزارع درگیر در سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ در محدوده ۴۰ تا ۵۰ مزرعه بوده است (۶). مطالعه دیگری نیز حاکی از آلودگی ماهیان دریائی در ۱۲ نمونه ماهی از مجموع ۱۹۲۷ ماهی در سواحل نروژ است (۲۷). تفاوت میزان آلودگی در گزارشات مختلف به عوامل گوناگونی از جمله محیط بررسی، سروتیپ ویروس، گونه ماهی، عوامل محیطی، عوامل استرس زا ، همچنین شیوه‌های پیشگیری و مدیریتی و تغییرات اقلیمی مربوط است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین آلودگی به سپتی سمیک هموراژیک بجز فصول سال ۱۳۹۳، در فصول گرم سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۷ روند کاهش داشته است. این یافته با نتایج تعدادی از مطالعات پیشین مطابقت دارد (۵). البته میانگین کل آلودگی نشان دهنده پراکندگی بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی در فصول مختلف است. در واقع بیماری

ویروسی سپتی سمی هموراژیک یک بیماری وابسته به دما است، بطوری‌که با کاهش دمای آب، موارد وقوع بیماری افزایش می‌یابد. همچنین شدت بیماری نیز تحت تأثیر دمای آب قرار دارد (۲۹). یافته‌های این مطالعه نشان داد که بیماری در سال های ۱۳۹۳،۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در ماهیان با دامنه وزنی ۵۰-۱ گرم شیوع بالاتری دارد. اگرچه میانگین کل آلودگی در ماهیان بزرگ‌تر بیشتر است بطوری‌که بیشترین میزان آلودگی در ماهیان با وزن بیش از ۲۰۰ گرم مشاهده شد. مطالعات نشان داده میزان وقوع و مرگ و میر سپتی سمی همراژیک در بچه ماهیان بیشتر و با افزایش سن از تلفات بیماری کاسته می‌شود (۱). در این مطالعه نیز بیشتر نمونه‌های ارسال شده به آزمایشگاه مربوط به بچه ماهیان بوده است و با افزایش وزن ماهی تعداد نمونه ارجاعی کاهش یافته است. نتایج مربوط به میزان ابتلا به ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده در سه گروه وزنی نشان دهنده اختلاف معنی داری بین هر سه گروه است ($p < ۰/۰۵$). با توجه به اینکه تعداد نمونه بررسی شده در ماهیان کوچک‌تر بسیار بیشتر بوده است لذا بنظر می‌رسد قضاوت نهائی در خصوص موارد وقوع بیماری نیاز به نمونه گیری بیشتری از ماهیان بزرگ تر دارد.

درخصوص نتایج آسیب شناسی نیز کانون‌های نکروز، تغییرات نکروتیک در سیتوپلاسم وهسته سلول‌های تشکیل دهنده بافت شامل ائوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم، پیکنوز، کاریورکسی و کاریولیزز در هسته، و نفوذ سلول‌های آماسی و تغییرات دژنراتیو از جمله واکوئله شدن سیتوپلاسم مشاهده شد. این یافته های هیستوپاتولوژیک با نتایج میکروسکوپیک خیابانیان و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد (۱۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بروز بیماری در استان‌های لرستان و چهارمحال و بختیاری بیشتر از استان اصفهان است. که بنظر می رسد علت آن کاهش تعداد و تراکم کمتر مزارع سردابی در استان اصفهان و بالا بودن دمای آب است. علاوه بر این استفاده از آب چاه یا استخرهای دومنظوره کشاورزی و پرورش ماهی در استان اصفهان در مقایسه با استفاده از آب‌های جاری همانند رودخانه در دو استان دیگر نیز عاملی در راستای کاهش احتمال بروز بیماری در استان اصفهان است. بسیاری از مراکز پرورش ماهی در استان‌های چهارمحال و بختیاری و لرستان بصورت متراکم در امتداد رودخانه و در فواصل کمی از یکدیگر واقع شده‌است که امکان انتقال آلودگی به سپتی سمی هموراژیک ازیک مزرعه پرورش ماهی به مزرعه پایین دست وجود دارد.

در سال‌های اخیر اگرچه صنعت پرورش ماهی قزل آلا رشد چشمگیری داشته است اما علی‌رغم ضعف در مدیریت بهداشتی مزارع پرورش ماهی شامل فقدان قرنطینه و راهکارهای مدون پیشگیری از بیماری و قرنطینه نامناسب در شیوع بیماری سپتی سمی هموراژیک نقش دارد (۲۳).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، وقوع بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ویروسی در دامنه سالیانه ۹ تا ۱۹ درصد در مزارع پرورش ماهی نوسان داشته است. بنظر می‌رسد مجموعه‌ای از اقدامات بتواند به مهار بیماری بینجامد که از آن جمله می‌توان به مولد سازی در راستای عدم نیاز به تخم چشم زده وارداتی، تدوین و اجرای قوانین پیشگیرانه، آموزش پرورش دهندگان ماهی، گندزدائی آب ورودی مزارع با استفاده از تکنولوژی‌های نوین همانند اشعه ماوراء بنفش، شناسائی کانون‌های آلودگی و حذف ماهیان مبتلا اشاره کرد. همچنین تلاش در زمینه تولید واکسن نیز می‌تواند نقش بسیار مهمی در کنترل بیماری داشته باشد اگرچه این

تلاش در سطح جهانی تاکنون منجر به تولید واکسن تجاری نشده است. بنظر می‌رسد موثرترین رویکردی که در کشورهای دیگر نتیجه مناسبی داشته است، ریشه کنی بیماری با حذف ماهیان آلوده است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تشکر خود از اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

1) Ahmadivand, S., Soltani, M., Mardani, K., Shokrpoor, S., Rahmati-Holasoo, H., Mokhtari, A., Hasanzadeh, R. (2016). Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Tropica*, **156**: 30-36.
2) Bain, M.B., Cornwell, E.R., Hope, K.M., Eckerlin, G.E., Casey, R.N., Groocock, G.H., Getchell, R.G., Bowser, P.R., Winton, J.R., Batts, W.N., Cangelosi, A., Casey, J.W. (2010). Distribution of an invasive aquatic pathogen (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) in the Great Lakes and its relationship to shipping. **PLos One**, **5**: e10156.
3) Bokaei S, Absalanfard K, Fallah Mehrabadi M, Ebrahimzadeh Mosavi H, Ghajari A, Shahbazian N. (2017). Investigation of Outbreaks of Viral Hemorrhagic Septicemia and Associated Risk Factors in Rainbow Trout Farms in Iran. *Iranian Journal of Epidemiology*, **13**: 253-261[In Persian].
4) Brunson R., True, K. and Yancey, J. (1989). VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter*, **17**: 3-4.
5) Cornwell, E,R,, Eckerlinm G.E., Getchell, R.G., Groocock, G.H., Thompson, T.M., Batts, W.N., Casey, R.N., Kurath, G., Winton, J.R., Bowser, P.R., Bain, M.B., Casey, J.W. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction from two fish species at two sites in Lake Superior. *Journal of Aquatic Animal Health*. **23**: 207-217.
6) Dale, O.B., Ørpetveit, I., Lyngstad, T. M., Kahns, S., Skall, H.F., Olesen, N.J. and Dannevig, B.H. (2009). Outbreak of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**: 93-103.
7) Deufel, J. (1959). Uber das Virus der infektiosen Nierenschwellung und Leberdegeneration und einige Bekampfungsversuche. *Allgemeine Fischerei-Zeitung*, **84**: 269.
8) Escobar, L.E., Escobar-Dodero, J., Phelps, N.B.D. (2018). Infectious disease in fish: global risk of viral hemorrhagic septicemia virus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **28**: 637-655.
9) Eckerlin, G.E., Farrell, J.M., Casey, R.N., Hope, K.M., Groocock, G.H., Bowser. P.R. and Casey, J. (2011). Temporal Variation in Prevalence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Type IVb among Upper St. Lawrence River Smallmouth Bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, **140**: 529-536.
10) Fadaeifard F, Raissy M, Moumeni M, Faghani M. (2012). Evaluation of Infectious Hematopoietic Necrosis, Infectious Pancreatic Necrosis and Viral Hemorrhagic Septicemia Viruses in Iranian and Imported Rainbow Trout Eggs: Across Sectional Study. *Journal*

11) Iran Fisheries Organization. (1398). Statistical Yearbook of Fisheries Organization, Tehran, Iran. 64 pages.

12) http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/2018/en#:~:text=The%20most%20recent%20official%20statistics,million%20people%20engaged%20in%20fisheries (accessed on 24 December 2020).

13) Gharaguozlo M, Ghajari A, Abdi K, Seifouri P, Fallah Mehrabadi M, Shahbazian N. (2018). Study on clinical and gross pathology manifestation of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran (2013-2015). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, **26**: 121-129. [In Persian].

14) Hakan Işıdan, H., Bolat, Y. (2011). A Survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **11**: 507-513.

15) Haghighi Khiabanian Asl, A. Bandehpour, M. Sharifnia, Z. Kazemi, B. (2008). Diagnosis of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) in Iranian rainbow trout aquaculture by pathology and molecular techniques. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, **28**: 170-175.

16) Hopper K. (1989). The isolation of VHSV from Chinook salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter*, 17: 1.

17) Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki, T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47**: 87-99.

18) Jensen, M.H. (1963). Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **59**: 131-134.

19) Jimenez de la Fuente, J., Marcotegui, M.A., San Juan, M.L. and Basurco, B. (1988). Diagnosis of viral diseases in salmonid farms in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **8**: 1-2.

20) Kaufman, J. and Holt, R.A. (2001). Isolation of North American viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from Columbia River smelt (*Thaleichthys pacificus*). *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter*, **29**: 1-3.

21) Kim, S.U., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S. and Park, S.I. (2003). Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Fish Pathology*, **16**: 1-12.

22) Kocan, R.M., Hershberger, P.K., Elder, N.E. and Winton, J.R. (2001). Epidemiology of viral hemorrhagic septicemia among juvenile Pacific herring and Pacific sand lances in Puget Sound, Washington. *Journal of Aquatic Animal Health*, **13**: 77-85.

23) Momeni H, Fadaeifard F, Momtaz H, and Momeni M. (2016). Nucleotide Sequencing and Phylogenetic Analysis of Glycoprotein Gene of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Isolated From Rainbow Trout In Chaharmahal And Bakhtiary Province. *Biological Journal of Microorganism*. **5**:1-10 [In Persian].

24) OIE. (2021). Accessible at https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/current/chapitre_diseases_listed.pdf

25) Raissy M, Momtaz H, Ansari M, Moumeni M, and Hosseinifard M. (2010). Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in two major rainbow trout fry producing *of Veterinary Research*, **67**: 393-397 [In Persian].

provinces of Iran with respect to clinically infected farms. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **8**: 614-615.

26) Roberts R.J., Smail D.A. and Munro E.S. (2012). In: Laboratory Methods, Fish Pathology. Wiley Publications, pp: 439-481.
27) Sandlund N, Gjerset B, Bergh Ø, Modahl I, Olesen NJ, Johansen R. (2014). Screening for viral hemorrhagic septicemia virus in marine fish along the Norwegian coastal line. *PLoS One*, **9**:e108529.
28) Snow, M., Bain, N., Black, J., Taupin, V., Cunningham, C.O., King, J.A., Skall, H.F. and Raynard, R.S. (2004). Genetic population structure of marine Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **61**: 11-21.
29) Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (2006). Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. Second Edition, New York: CAB Publishing Company, pp: 110-121.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 1, 2021

The study of the outbreak of Viral Hemorrhagic Septicemia in rainbow trout fish farms during 2014-2018 from Chaharmahal va Bakhtiari, Lorestan and Isfahan Provinces

Mehdi Raissy[1*], Keyvan Sadeghian[2], Ardeshir Ganji[2], Abdolrasoul Namjou[3], Mazaher Zamani[2], Dariush Azadikhah[4], Mehran Mehdipoor[5]

1. Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Veterinary Association, Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran.

3. Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

Received: 15 August 2021 *Accepted: 30 January2022*

Abstract

Viral Hemorrhagic Septicemia is one of the most important infectious diseases of cultured fish, causing mass mortality, especially in rainbow trout. This study aimed to investigate the occurrence and pathological lesions of VHS in Chahrmahal va Bakhtiari, Lorestan, and Isfahan Provinces, between 2014 and 2018. The virus was identified using the RT-PCR method in clinically suspected fish. According to the obtained results, 202 samples (13.33%) of 1515 studied samples were infected with Viral Hemorrhagic Septicemia Virus. The infection rates during the study were 14.65% in Chaharmahal va Bakhtiari, 15.16% in Lorestan, and 8.5% in Isfahan Provinces. Comparison of the infection rate in fish with different weights indicated that the highest level of infection was in the fish weighing above 200 g (28.22%). The infection rate in fish with 5-200 g and 1-50 g weight was 19.44 and 8.6%, respectively. Considering that the disease has been fluctuating in the range of 9-19% during the study, full-scale and drastic actions are necessary for eradicating Viral Hemorrhagic Septicemia.

Keywords: Viral Hemorrhagic Septicemia, rainbow trout, VHS, RT-PCR.

**Corresponding author: Mehdi Raissy*

Address: Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord

E. mail: mehdi.raissy@iaushk.ac.ir