1066-AMIWR2019

بررسی مقایسه ای روش های گوناگون تشخیص بیماری ویروسی نکروز عصبی(VNN) در ماهیان

مینازیارتی[۱]*، سید محمدجلیل ذریه زهرا[۲]

۱-دانشجوی دوره دکترای رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲-دانشیار پژوهشی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهادکشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، تهران، ایران

mziarati2@gmail.com

چکیده:

در سرتاسر جهان استفاده از ماهیان به عنوان پروتئین حیوانی، رو به افزایش است و نقل و انتقال آبزیان به عنوان یک راه تجارت در میان کشورهای جهان، مورد توجه قرار دارد. همه ساله بروز بیماری ویروسی نکروز عصبی(VNN) در ماهیان به عنوان میزبان اصلی آنان، خسارات فراوانی به صنعت شیلات وارد می کند. بدون شک یکی از راههای موفقیت در صنعت آبزی پروری آینده، تشخیص سریع و پیشگیری از بیماری آبزیان خواهد بود که هم اکنون بزرگترین عامل ضرر و زیان در صنعت پرورش آبزیان می باشند. عدم تشخیص قطعی عامل بیماری زا در آبزیان، منجر به افزایش کاربرد آنتی بیوتیک ها شده و ضمن اینکه ممکن است به درمان قطعی منتهی نگردد، باعث توسعه مقاومت های داروئی نیز می شود. از اینرو طولانی شدن زمان شناسایی و تشخیص عامل بیماری زا موجب شیوع بیشتر بیماری، افزایش تلفات و خسارات بیشتر در کارگاه های پرورش ماهی و هزینه های ناشی از آن می گردد. مستندات OIE و مقالات گوناگون، ابزارها و روش های معتبری را در تشخیص بتانوداویروس معرفی می نمایند که با توجه به نوع نمونه و امکانات دردسترس می توان آن ها را به کار گرفت. در این راستا انتخاب یک روش تشخیص معتبر و سریع سهم بسزائی در بهبود روش های کنترل، پیشگیری و مبارزه با گسترش این بیماری جهان گستر خواهد داشت. بنابراین هدف از این مطالعه مقایسه روش های مختلف تشخیص VNN و بررسی مزایا و معایب آن هاست.

کلمات کلیدی: بیماری ویروسی نکروز عصبی، روش های تشخیص، کنترل، پیشگیری

مقدمه:

یکی از بیماری های عفونی که ماهیان سرتاسر جهان را تحت تاثیر قرار می دهد، عارضه نکروز عصبی ویروسی است که به عنوان یک بیماری نوروپاتوژنیک و به نام VNN یا VER شناسایی شده است. ویروس عامل VNN از خانواده نوداویریده و جنس بتانوداویروس است. ویروس بدون پوشینه و بیست وجهی، متشکل از دو مولکول RNA تک رشته ای با قطبیت مثبت است (Bellance and Gallet., 1988; OIE., 2017). بیماری VNN به طور اصلی مراحل لاروی و جوانی ماهیان را تحت تاثیر قرار می دهد (Banerjee et al., 2014) و از عفونت حاد (Acute) با علائم بالینی و مرگ و میر ۱۰۰٪ تا عفونت مزمن و پایدار در دنیا وجود دارد. علائم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی همچون رفتار شنای غیرمعمول، شنای سریع و ناگهانی است و علائم ظاهری دیگر همچون اتساع کیسه شنا، تیرگی پوست و بیحالی نیز مشاهده می گردد (Low *et al.*, 2017; OIE., 2017). مطالعات مختلف نشان داده که ماهیان عفونی با VNN، توانایی انتقال افقی و عمودی ویروس به نسل های بعدی را دارند و ماهی به عنوان یک لنگرگاه ویروس، سبب انتقال عفونت به ماهیان دیگر می شود(Nerland *et al.*, 2007 ;OIE., 2017). یکی از ماهیان اقتصادی مهم منطقه خلیج فارس جنس Epinephelus یا ماهی هامور (Grouper) است که حساسیت بالای آن به VNN نیز تائید شده است (Vendramin *et al.*, 2013). روش های گوناگونی جهت تشخیص بتانوداویروس از ماهیان

با علائم بالینی و ماهیان تحت بالینی وجود دارد. ضمن آنکه انتخاب یک روش آزمایش مناسب برای تشخیص بیماری و نتایج معتبر، براساس برخی ملاحظات انجام می گردد که از آن ها میتوان: نوع نمونه، امکانات و تجهیزات دردسترس، پذیرش بین المللی روش و عدم منسوخیت آن، کارایی روش (حساسیت و اختصاصیت تشخیص و آنالیز)، هزینه و زمان انجام آزمایشات، تکرارپذیری روش و ... را نام برد (OIE., 2003). در این راستا جهت تشخیص VNN به عنوان یک تهدید جدی آبزیان جهان (Costa and Tompson., 2016)، روش های گوناگونی مورد آزمایش و معرفی قرار گرفته شده که در این مقاله مزایا و معایب هرکدام به تفکیک مورد ارزیابی قرار داده شده است.

روش کار:

مستندات OIE و مقالات گوناگون، ابزارها و روش های معتبری را در تشخیص بتانوداویروس معرفی می نمایند که با توجه به نوع نمونه و امکانات دردسترس، می توان آن ها را مورد استفاده قرار داد. در پژوهشی که از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ جهت تشخیص بتانوداویروس در ماهیان هامور وحشی و پرورشی منطقه خلیج فارس انجام گرفت، روش های گوناگونی مورد آزمایش و ارزیابی قرار داده شدند که شامل: کیت تشخیص سریع، روش های مولکولی PCR، Nested-PCR، qPCR و روش Cell Culture می باشند(OIE., 2017).

نتایج و بحث:

در این پژوهش که روش های گوناگون جهت تشخیص بتانوداویروس از ماهیان با علائم بالینی و ماهیان تحت بالینی انجام گرفت، مزایا و معایب هر کدام از روش ها مورد ارزیابی و بحث قرار گرفته است.

کیت تشخیص سریع(Rapid Diagnosis Kit): این روش از سریع ترین و در دسترس ترین روش تشخیص ویروس در ماهیان می باشد. مزایا این روش: دسترسی آسان، سرعت بالا در کسب نتایج، عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه پائین آن است ولی از معایب آن می توان عدم حساسیت و اختصاصیت آن به همه ژنوتایپ های ویروسی را نام برد(حسن تبار، ۱۳۹۷).

PCR: در این روش یک جفت پرایمر اولیگونوکلئوتید برای تکثیر قطعه کوچکی از ژنوم عامل عفونی استفاده می گردد و حساسیت روش با تشخیص حداقل ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ کپی، نسبتا بالاست. اختصاصیت روش نیز بالا است ولی هردو مورد حساسیت و اختصاصیت با روشNested-PCR بهبود داده می شود(OIE., 2003). یکی از مهم ترین محدودیت های این روش خطر بالای بروز آلودگی در حین کار است (Panteghini and Forest., 2005). البته گاهی اوقاتPCR به اندازه کافی اختصاصی عمل نمی کند و شامل قطعات غیر اختصاصی DNA و در نتیجه باندهای اضافی است (Garibyan and Avashia, 2013). از طرف دیگر برخی از نتایج PCR نیازمند تفسیر دقیق و ماهرانه هستند (Favrot., 2015). دیگر معایب آن نیز زمان بر بودن روش است (Hijia., 2017).

Nested PCR: در این روش دو سیکل تکثیر با ۴ پرایمر به نام پرایمرهای داخلی و خارجی انجام می گیرد که حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری به نسبت PCR فراهم می آورد. حساسیت روش معمولا ۱۰> کپی از ژنوم عامل عفونی است و بدلیل استفاده از ۴ اولیگونوکلئوتید در اتصال اختصاصی به توالی هدف، اختصاصیت روش نیز بالاست(Dalla *et al*., 2000; OIE., 2003, Gomez *et al*., 2004). ضعف این روش احتمال آلودگی هنگام انتقال محصول مرحله اول به میکروتیوپ دوم جهت انجام مرحله دوم و وقت گیر بودن آن است (Panzarin *et al*., 2010).

Real Time: این یک نوع روش تکثیر بوده که در طول چرخه تکثیر، محصولات واکنش مستقیما و با استفاده از یکسری رنگ های اختصاصی شناسایی می گردند. این روش در مقایسه با روش های PCR یا Nested-PCR مزیت هایی دارد همچون: استفاده از جفت پرایمر برای بهبود حساسیت روش، افزایش سرعت، کاهش هزینه ها و خطر آلودگی، عدم استفاده از مواد

خطرناک همچون اتیدیوم بروماید، امکان انجام روش کمی جهت تشخیص، استفاده از رنگ های نمایانگر تکثیر ویروس، عدم نیاز به ژل آگاروز (OIE., 2003). با وجود مزایای آن، معایبی همچون هزینه بالا ی مواد و تجهیزات و بندرت تشکیل پرایمردایمر وجود دارد (Lovatt., 2002).

Cell Culture: این روش به عنوان Gold standard تشخیص ویروس نزد سازمان (OIE) محسوب می گردد. دو تیره سلولی به کارگرفته شده در روش فوق، E11 وSSN1 است. روش مذکور حساسیت بسیاربالایی در تشخیص ویروس از ماهیان بدون علائم و تحت کلینیکی محسوب می گردد ولیکن زمانبر و پرهزینه است (OIE., 2017).

نتیجه گیری:

بتانوداویروس به عنوان یکی از جدی ترین تهدید بسیاری از گونه های ماهیان دریایی تشخیص داده شده و مسبب زیان های اقتصادی فراوان در صنعت آبزیان می گردد (Daon *et al*., 2016) و از طرف دیگر ماهیان عفونی بدون علائم به عنوان منبع اصلی انتقال عفونت هستند (Costa and Tompson., 2016) بنابراین غربالگری ماهیان دریایی حساس به این ویروس بسیار حائز اهمیت است. در مجموع از میان روش های مورد استفاده جهت تشخیص ویروس باید ذکر شود که کیت تشخیص سریع و روش PCR سریع ترین و در دسترس ترین روش تشخیص ویروس در ماهیان عفونی کلینیکی و Nested PCR و Real Time روش مفیدی جهت شناسایی ویروس در ماهیان عفونی Subclinical (ماهیان ناقل) هستند. به طور معمول برای تشخیص بیماری های ویروسی، روش های مولکولی دارای مزیت هایی همچون: زمان کوتاه، سرعت، حساسیت و اختصاصیت بالا می باشند. در این زمینه با وجود روش مناسب کشت سلولی، بدلیل وقت گیر بودن آن، کمتر استفاده شده و اخیرا روش های مولکولی بدلیل سرعت، حساسیت و اختصاصیت بسیار مورد توجه قرار دارد. هرچندکه جداسازی ویروس با کشت سلولی به دنبال تشخیص مولکولی، هنوز به عنوان Gold standard ویروس محسوب می گردد (OIE., 2003; OIE., 2017). باید به این مسئله توجه نمود که ماهیان بیشترین نقش را در انتشار بیماری به مناطق جدید دارند، بنابراین برنامه پایش و مراقبت حائز اهمیت است (Zorriehzahra et al., 2016). از طرف دیگر با توجه به اهمیت اقتصادی گونه های ماهیان خلیج فارس و نیز برنامه های توسعه ای شیلات ایران در زمینه پرورش ماهی در قفس، غربالگری ماهیان بدون علائم توسط روش های تشخیصی سریع و همچنین سایر روش های تشخیصی دقیق در موارد ابتلای احتمالی و در راستای کنترل و حمایت ذخایر آبزیان در آب های جنوب کشور می تواند مورد نظر محققین و کارشناسان عرصه های مختلف شیلاتی کشور قرارگیرد.

منابع:

۱-حسن تبار، فاطمه.، ذریه زهرا، سید محمدجلیل.، فیروز بخش، فرید.، تامپسون.، کیم.۱۳۹۷. بررسی امکان سنجی ساخت کیت تشخیص سریع بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) به منظور ردیابی سریع بیماری (VNN) با استفاده از تست ایمونو کروماتوگرافی ومقایسه آن با روش های RT-PCR و ایمنوهیستوشیمی(IHC) ، پایان نامه دوره دکتری تخصصی رشته تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۲۷۰ صفحه.

2-Banerjee, D., Hamod, M.A., Suresh, Th., Karunasagar, I. 2014. Isolation and characterization of a nodavirus associated with massmortality in Asian seabass (*Lates calcarifer*) from the west coast of India. *VirusDis*. 25(4):425–429.

3-Bellance, R., Gallet, D. 1988. L'encephalite virale loup mer Caraibes Med. 2, 105-144.

4-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.

5-Dalla, V. L., Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P., Colombo, L. 2000. Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J Fish Dis* 23:321–327.
6-Doan, Q.K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., Allal, F. 2016. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, DOI: 10.1111/jfd.12541.
7-Favrot, C. 2015. Polymerase chain reaction: advantages and drawbacks. In: 3. Congresso Latinoamericano de Dermatologia Veterinaria, Buenos Aires, Argentina, 26 November 2015 - 27 November 2015.
8-Garibyan, L and Avashia, N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) *J Invest Dermatol.* March ; 133(3): e6. doi:10.1038/jid.2013.1.
9-Gomez, D.K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y., Nakai, T. 2004. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild fish with no clinical signs. *J Fish Dis* 27:603–608.
10-Hajia, M. 2017. Limitations of Different PCR Protocols Used in Diagnostic Laboratories: A Short Review. *Modern Medical Laboratory Journal*. Review Article | Mod Med Lab. 2017; 1(1): 1 – 6.
11-Lovatt, A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J Biotechnol*; 82(3):279- 300.
12-Low, C.F., SyarulNataqain, B., Chee, H.Y., Rozaini, M.Z.H., Najiah, M. 2017. Betanodavirus: Dissection of the viral life cycle: REVIEW. *Journal of Fish Diseases*, DOI: 10.1111/jfd.12638.
13-Nerland, A.H., Skaar, C., Eriksen, T.B., Bleie, H. 2007. Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibutHippoglossus hippoglossuslarvae. *Dis Aquat Organ*; 73:201–5.
14-OIE. 2003. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.
15-OIE. 2017. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. CHAPTER 2.3.12. VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY.
16-Panteghini, M., Forest, J.C. 2005. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta*; 355(1-2):1-12.
17-Panzarin, V., Patarnwllo, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappellozza, E., Bovo, G., Cattoli, G. 2010. Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol*., 155, 1193–1203.
18-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 forwild endangered species?. *BMC Veterinary Research*,9:20.
19-Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., HaghighiKarsidanid, S., Bovo, G., Nazari, A., Adel, M., Arizza, V., Dhamah, K. 2016. Isolation and confirmation of viral nervous necrosis (VNN) disease in golden grey mullet (Liza aurata) and leaping mullet (Liza saliens) in the Iranian waters of the Caspian Sea. *Vaterinary Microbiology;* 196; 27-37.