

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی کشور

عنوان:

دستیابی به دانش فنی تولید و ارزیابی  
کیت تشخیص بیماری سپتی سمی  
خونریزی دهنده ویروسی (VHS)

مجری:

محدث قاسمی

شماره ثبت

۶۳۵۸۸

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبیاری پروری آبهای داخلی کشور

عنوان طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی تولید و ارزیابی کیت تشخیص بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده  
ویروسی (VHS)

کد مصوب: ۹۶۱۷۲۳-۱۰۶-۱۲-۷۳-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: محدث قاسمی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: محدث قاسمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): امرالله قاجاری، سمیه حقیقی کارسیدانی، محمدرضا مهرابی، مهتاب  
یارمحمدی، سید رضا سیدمرتضائی، علی نکوئی فرد، مریم قیاسی، محمد میثم صلاحی، محمد جواد رسایی،

فاطمه حسن تبار، شاپور کاکولکی، جواد دقیق روحی، منیره فنید، مهدی مرادی چافی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان گیلان

تاریخ شروع: ۱۳۹۶/۱۰/۱

مدت اجرا: ۴ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۱

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»**

طرح/پروژه: دستیابی به دانش فنی تولید و ارزیابی کیت تشخیص

بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS)

کد مصوب: ۹۶۱۷۲۳-۱۰۶-۱۲-۷۳-۲

شماره ثبت (فروست): ۶۳۵۸۸ تاریخ: ۱۴۰۲/۳/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محدث قاسمی دارای مدرک

تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان

می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان

در تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۲۲ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبی پروری آبهای

داخلی کشور مشغول بوده است.

صفحه	«فهرست مندرجات»	عنوان
۱	.....	چکیده
۲	.....	۱-مقدمه
۲	.....	۱-۱-ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHSV).....
۳	.....	۱-۲-میزان تولید ماهی قزل آلا در ایران.....
۴	.....	۱-۳-سنجش های سریع.....
۴	.....	۱-۳-۱-معرفی.....
۴	.....	۱-۳-۲-ساختار.....
۴	.....	۱-۳-۳-پادتن ها (ایمنوگلوبولین ها).....
۵	.....	۱-۳-۴-پادتن های چند دودمانی.....
۵	.....	۱-۳-۵-پادتن های تک دودمانی.....
۵	.....	۱-۳-۶-فرمت های نوآر ایمنوگروماتوگرافی.....
۷	.....	۱-۳-۷-نشانه (Lable).....
۸	.....	۱-۴-مروری بر پژوهش های انجام شده در زمینه تولید پادتن ها چند دودمانی علیه VHS در ایران و جهان.....
۸	.....	۱-۵-مروری بر پژوهش های انجام شده در زمینه طراحی کیت تشخیص سریع نواری آبی پروری در ایران و جهان.....
۱۲	.....	۲-مواد و روش کار.....
۱۲	.....	۲-۱-مواد.....
۱۲	.....	۲-۱-۱-مواد مصرفی در شناسایی ویروس.....
۱۳	.....	۲-۱-۲-لوازم غیرمصرفی شناسایی ویروس.....
۱۳	.....	۲-۱-۳-لوازم و مواد مصرفی استخراج آنتی بادی و تولید کیت.....
۱۵	.....	۲-۲-روش کار.....
۱۵	.....	۲-۲-۱-نمونه برداری و بررسی علائم بالینی ماهیان.....
۱۶	.....	۲-۲-۲-کشت سلول.....
۱۷	.....	۲-۲-۳-آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم (IFAT) بر روی کشت سلولی.....
۱۸	.....	۲-۲-۴-آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR.....
۲۲	.....	۲-۲-۵-تهیه آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی با استفاده از پروتئین ویروسی VHSV.....

۲-۲-۶-طراحی تست ایمونوکروماتوگرافی نواری برای تشخیص سریع سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS).....	۳۰
۲-۲-۷-بررسی تست ایمونوکروماتوگرافی نواری تولید شده با نمونه ماهی.....	۳۷
۲-۳-تجزیه و تحلیل داده ها.....	۳۹
۳-نتایج.....	۴۰
۳-۱-مشاهدات بالینی و کالبد گشایی.....	۴۰
۳-۲-کشت سلولی.....	۴۱
۳-۳-آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم.....	۴۳
۳-۴-RT-PCR.....	۴۴
۳-۵-ایمن سازی خرگوش با استفاده از سوپ سلولی آلوده به ویروس VHSV.....	۴۵
۳-۵-۱-تغلیظ سوپ سلولی آلوده به ویروس.....	۴۵
۳-۵-۲-بررسی ویروس تغلیظ شده با استفاده از SDS-PAGE.....	۴۶
۳-۵-۳-تعیین تیتراژ آنتی بادی خرگوش ایمن شده با ویروس VHSV.....	۴۶
۳-۵-۴-نتایج مربوط به تهیه پلی کلونال آنتی بادی خالص (IgG) پس از عبور از افینیتی کروماتوگرافی پروتئین ها.....	۴۷
۳-۶-ساخت نانوذرات طلا.....	۴۸
۳-۷-بهینه سازی اتصال نانوذرات طلا به آنتی بادی.....	۴۹
۳-۷-۱-تاثیر اندازه نانوذرات طلا بر روی فرایند کونژوگاسیون.....	۴۹
۳-۷-۲-تعیین pH و غلظت مناسب برای اتصال (کونژوگه) آنتی بادی با نانوذرات طلا.....	۴۹
۳-۸-آماده سازی نوارهای تست ایمونوکروماتوگرافی.....	۵۰
۳-۸-۱-پد نمونه و کونژوگه.....	۵۰
۳-۸-۲-پد غشاء.....	۵۰
۳-۸-۳-طراحی نوار ساندویچ کروماتوگرافی با ۴ حالت ممکن جهت ردیابی ویروس VHSV.....	۵۱
۳-۹-ارزیابی تست با نمونه های مختلف بافت ماهی و تعیین حساسیت، ویژگی، صحت و دقت تست.....	۵۹
۳-۱۰-بررسی واکنش متقاطع.....	۶۱
۳-۱۱-نتایج پایداری کیت نواری تولید شده.....	۶۱
۴-بحث.....	۶۳

پیشنهادها..... ۶۸

منابع..... ۷۰

چکیده انگلیسی..... ۷۲

## چکیده

مقدمه: افزایش تقاضای مصرف غذاهای دریایی و محدودیت ظرفیت صید آبزیان وحشی موجب توسعه آبرزی پروری شده است اما واردات بی رویه تخم چشم زده، مولدین و ماهیان زینتی زمینه ساز گسترش بیماری های ویروسی در کشور گردیده و موارد متعددی از بروز تلفات ویروسی و خسارت به پرورش دهندگان گزارش شده است. یکی از بیماری های مهلک ویروسی ماهیان سردابی که در چند سال اخیر شیوع پیدا کرده سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS) است.

هدف: از آنجا که روش های تشخیصی رایج مانند کشت سلولی و مولکولی زمانبر و هزینه بر هستند و تشخیص سریع بیماری های ویروسی یکی از ارکان کنترل سریع بیماری می باشد این پروژه برای دستیابی به دانش فنی تولید و ارزیابی کیت تشخیص بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS) طراحی گردید.

روش کار: در طراحی آزمون ایمنو کروماتوگرافی از اشکال مختلف پادتن های تک دودمانی تجاری و پادتن های چند دودمانی تولید شده در خرگوش نیوزلندی با نوزریق سویه استاندارد ویروس VHS استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه غلظت بهینه پادتن های مورد استفاده برای جفت سازی و پوشش دهی نانوذرات طلا ۵ میکروگرم/میلی لیتر گزارش شده است. همچنین ۱/۸ میلی گرم/میلی لیتر پادتن چند دودمانی برای پوشش دهی در منطقه خط تست غشای نیتروسلولز بعد از بهینه سازی استفاده شد. برای زمان واکنش در این مطالعه زمان های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با یکدیگر مقایسه شدند و مشخص شد که حساسیت بین ۲۰ و ۲۵ دقیقه مشابه بوده اما بیشتر از ۱۵ دقیقه بود. بنابراین، زمان واکنش این نوار ایمنو کروماتوگرافی در ۲۰ دقیقه تنظیم شد.

نتیجه گیری: روش های کشت سلول و مولکولی که معمولاً جهت تشخیص ویروس استفاده می شوند علاوه بر زمان بر بودن به تجهیزات آزمایشگاهی و تکنسین آموزش دیده نیاز دارد. بنابراین برای کاهش هزینه های برنامه غربالگری درجا، استفاده از روش های تشخیص سریع برای شناسایی سریع و ارزان بیماری بسیار کمک کننده خواهد بود.

**کلمات کلیدی:** سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی، آنتی بادی، نانوذره طلا، کیت تشخیص سریع