وزارت جهادکشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

بررسی امکان سنجی ساخت واکسن بتانوداویروس کشته علیه عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) و ارزیابی اثربخشی و ایمنی زائی آن در ماهی Guppy به عنوان مدل آزمایشگاهی

مجری:
سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا

شماره ثبت
۵۹۲۰۲

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

عنوان طرح/ پروژه: بررسی امکان سنجی ساخت واکسن بتانوداویروس کشته علیه عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) و ارزیابی اثربخشی و ایمنی زائی آن در ماهی Guppy به عنوان مدل آزمایشگاهی
کد مصوب: ۹۴۱۰۳-۱۲-۷۳-٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد): -
نام و نام خانوادگی مجری: سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا
نام و نام خانوادگی همکار(ان): عیسی شریف‌پور، شاپور کاکولکی، مریم دادار، محدث قاسمی، میلاد عادل، رضا مطلب، فاطمه حبیبی صالح، بابک رمضانی عاقله
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): امین نعمت الهی
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱/۳/ ۱۳۹٤
مدت اجرا: ۳ سال و ۱۰ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: ۱۳۹۹
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: بررسی امکان سنجی ساخت واکسن بتانوداویروس کشته علیه عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) و ارزیابی اثربخشی و ایمنی زائی آن در ماهی Guppy به عنوان مدل آزمایشگاهی

کد مصوب : ۹۴۱۰۳-۱۲-۷۳-٤

شماره ثبت (فروست) : ۵۹۲۰۲ تاریخ : ۱۳۹۹/۱۲/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۳۹۹/۱۱/۲۸ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور (ستاد – تهران) مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۳
۱-۱ اهمیت ماهیان زینتی ۴
۱-۲ ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) ۴
۱-۲-۱- عوامل مؤثر در رسیدگی جنسی ۵
۱-۲-۲- بیماری های ماهی گوپی ۱۲
۱-۳-کفال ماهیان ۲۲
۱-۴- آشنایی با گونه های با ارزش ماهیان خاویاری دریای خزر ۲۶
۱-۴-۱- فیل ماهی (*Huso huso*) ۲۶
۱-۴-۲- قره برون (تاسماهی ایرانی) (*Acipenser persicus*) ۲۷
۱-۴-۳- تاسماهی روسی(چالباش) (*Acipenser quldenstadti*) ۲۸
۱-۴-۴- ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) ۲۹
۱-۴-۵- ماهی ازون برون(*Acipenser stellatus*) ۳۰
۱-۵-بتانوداویروس ۳۱
۱-۵-۱-بتانوداویروس و نام گذاری آن ۳۱
۱-۵-۲- رده بندی بتانوداویروس‌ها ۳۱
۱-۵-۳- ساختار و ژنوم بتانوداویروس ۳۲
۱-۵-۴- ژنوتایپ و سروتایپ بتانوداویروس ۳۳
۱-۵-۵- انواع عفونت های بتانوداویروس ۳۴
۱-۵-۶- علایم بالینی بیماری ۳۴
۱-۵-۷- ضایعات بافتی ناشی از بتانوداویروس ۳۶
۱-۵-۸- راه های انتقال بتانوداویروس و ناقل های آن ۳۶
۱-۵-۹-پایداری و روش های غیرفعال سازی ویروس ۳۸
۱-۶- چرخه زندگی بتانوداویروس ۳۸
۱-۶-۱-تروپیسم بافتی و راه ورود ویروس ۳۹
۱-۶-۲- اتصال ویروس به سلول میزبان جهت ورود ۳۹
۱-۶-۳- تکثیر ویروس و بیان ژن های موثر بر آن ۴۰
۱-۶-۴- خروج ویروس از میزبان ۴۲

۱-۷- پراکنش جغرافیایی ۴۲
۱-۸- دوره انکوباسیون ویروس و فاکتورهای موثر بر بیماری زایی ۴۲
۱-۹- کنترل و درمان ۴۴
۱-۱۰- روش های تشخیص بتانوداویروس ۴۵
۱-۱۰-۱-انتخاب روش آزمایش ۴۵
۱-۱۰-۲- انواع روش های تشخیص ویروس ۴۶
۱-۱۱- توالی یابی ۵۰
۱-۱۲- بیماری نکروز عصبی ویروسی(VNN) ۵۱
۱-۱۲-۱- عامل ایجاد بیماری VNN ۵۱
۱-۱۲-۲- مشخصات زیستی ویروس مسبب VNN ۵۱
۱-۱۲-۳- روش های شناسایی و تشخیص بیماری VNN ۵۲
۱-۱۲-۴- فرایند بیولوژیک و حساسیت های ویروس ۵۴
۱-۱۲-۵- روش های کنترل و پیشگیری ۵۷
۱-۱۲-۶- درمان ۵۸
۱-۱۳- سابقه و پیشینه تحقیق ۵۸
۱-۱۳-۱- سوابق تحقیقات انجام شده در جهان ۵۹
۱-۱۳-۲- سوابق تحقیقات انجام شده در ایران ۶۰
۱-۱۴-اهداف ۶۳
۲-مواد و روش ها ۶۴
۲-۱- خنثی سازی و بی اثر نمودن نمونه استوک ویروس جهت آغاز فعالیت های واکسن سازی و ورود آن از کشور انگلستان ۶۴
۲-۲- تهیه و خرید ادجوانت های مورد نیاز همچون Monatanide ، آلومینیوم هیدروکساید و مونتاناید داخلی ساخت موسسه پاستور ایران ۶۵
۲-۳- تهیه واکسن علیه بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) ۶۶
۲-۴- تهیه ویروس غیر فعال شده ۶۷
۲-۵- تهیه و خرید ۵۴۰ نمونه بچه ماهی خاویاری به منظور تست واکسن بر روی آنها و استقرار و آداپتاسیون آنها در سایت مربوطه ۶۹
۲-۵-۱-تهیه و تجهیز سایت محل انجام آزمایش تزریق و کاربرد واکسن به آکواریوم ها ۷۰
۲-۵-۲- سازگاری (آداپتاسیون) ونگهداری ماهی ۷۲
۲-۵-۳- اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی آب ۷۲

۲-۵-۴- هماهنگی با بخش بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و آماده سازی واکسن مورد نظر ۷۳
۲-۵-۵- برنامه ریزی و هماهنگی با آزمایشگاه جهت انجام خونگیری های مورد نظر از ابتدا تا پایان دوره ۷۴
۲-۵-۳- کاربرد و مصرف واکسن به دو روش غوطه وریدی و تزریق در محوطه بطنی بر روی بچه ماهیان خاویاری ۷۵
۲-۶- تیمار بندی ماهیان ۷۶
۲-۷- پروتکل آماده سازی و ساخت واکسن نکروز عصبی ویروسی(VNN) ۷۹
۲-۷-۱- شکل غوطه وری ۷۹
۲-۷-۲- شکل تزریقی ۷۹
۲-۸- بررسی بیماری زایی نمونه ویروسی (سوپرناتانت) تهیه شده (مواجه سازی اولیه) در ماهیان گوپی ۸۳
۲-۹- خونگیری و اندازه گیری فاکتورهای خونی و سرمی ۸۶
۲-۹-۱- خونگیری ۸۶
۲-۹-۲- تهیه سرم خون ۸۶
۲-۹-۳- اندازه گیری فاکتورهای خونی ۸۶
۲-۹-۴- اندازه گیری فاکتورهای ایمنی ۸۶
۲-۱۰-آسیب شناسی ۸۷
۲-۱۰-۱-آزمون ایمونوهیستوشیمی(IHC) ۸۸
۲-۱۱- آنالیز آماری داده ها ۹۰
۳- نتایج ۹۱
۳-۱-مقدمه ۹۱
۳-۲- درصد نرخ مرگ و میر (MR) ۹۱
۳-۳- نتیجه قابلیت بیماری زایی نمونه ویروسی (سوپرناتانت)تهیه شده در مواجهه سازی اولیه ۹۲
۳-۴- نتایج ابتلای بچه ماهیان خاویاری به VNN پس از مواجهه سازی نهایی ۹۲
۳-۵- اندازه گیری فاکتور های خونی ۹۲
۳-۵-۱- نتایج اندازه گیری شاخص های مرتبط با گلبول قرمز در زمان قبل و بعد از مواجه شدن با ویروس VNN ۹۲
۳-۵-۲- نتایج اندازه گیری شاخص های مرتبط با گلبول سفید ۹۷
۳-۶- اندازه گیری فاکتورهای ایمنی ۱۰۱
۳-۶-۱- نتایج اندازه گیری فاکتور ایمونوگلوبولین در زمان قبل و بعد از مواجه سازی با ویروس VNN به روش آزمون ELISA ۱۰۱
۳-۷-نتایج حاصل از اندازه گیری سنجش سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سرم بدست آمده از نمونه خون تیمار ها در زمان قبل و بعد از مواجهه سازی با ویروس VNN ۱۰۵

۳-۸- نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر لیزوزیم موجود در سرم خون قبل و بعد از مواجهه سازی با ویروس VNN ۱۰۸
۳-۹- نتایج آزمون IHC و آسیب شناسی پس از مواجهه سازی نهایی ۱۱۰
۳-۹-۱- مشاهدات بالینی ۱۱۰
۴-بحث ۱۱۸
۴-۱- درصد بقا ۱۱۸
۴-۲- فاکتورهای خونی ۱۱۹
۴-۳- فاکتورهای ایمنی ۱۲۲
۴-۴- آسیب شناسی و ایمونوهیستوشیمی (IHC) ۱۲۴
۵- نتیجه گیری ۱۲۸
پیشنهادها ۱۲۹
منابع ۱۳۰
پیوست ۱۳۸
پیوست ۱ راهنمای استفاده از کیت ELISA برای سنجش IgM ساخت شرکت ZellBio GmbH..... ۱۳۹
پیوست ۲ : نحوه انجام آزمایش جهت اندازه گیری سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از کیت مخصوص پارس آزمون تهران..... ۱۴۵
چکیده انگلیسی ۱۴۸

چکیده

این مطالعه به منظور تحقیق و امکان سنجی ساخت واکسن نکروز عصبی ویروسی (VNN) با استفاده از سروتیپ RGNNV جدا شده از ماهیان کفال طلایی دریای خزر برای اولین بار در کشور صورت گرفت. آنسفالوپاتی و رتینوپاتی ویروسی(VER) که به نام های آنسفالوپاتی Seabass ، نکروز عصبی ویروسی آنسفالومیلیت Turbot و آنسفالوپاتی ماهی نیز شناخته می شود، به شرایط نوروپاتوبیولوژیکی گفته می شود که گونه های مختلفی از ماهیان را تحت تاثیر قرار می دهد و به وسیله تعداد معدودی از عوامل ویروسی متعلق به خانواده نوداویریده(Nodaviridae) جنس نوداویروس ایجاد می شود. بتانوداویروس ها عامل بروز بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در گونه های مختلف ماهیان در سرتاسر جهان هستند این بیماری عمدتا در ماهیان جوان و لاروها اتفاق می افتد. ماهیان بیمار دارای علائم شنای غیر طبیعی، عدم تعادل، مشکلات عصبی، بزرگ شدن کیسه شنا، تیرگی رنگ و مرگ می باشند بتانوداویروس تمایل به بافت های عصبی از جمله مغز و شبکیه چشم دارد.

دریافت گزارش وقوع مواردی از این بیماری در سواحل کویت در ماهیان مختلف و نیز گزارش رسمی اخیر از وقوع این بیماری در خلیج فارس توسط محققین و حضور گسترده این بیماری در دریای مدیترانه و نیز خطر ابتلا ذخایر باقیمانده ماهیان استخوانی به این بیماری غیرقابل درمان، اهمیت ساخت واکسن موثر و کارای VNN، جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری مهلک و جهان گستر را دوچندان می کند.

در این تحقیق به تولید و ارزیابی واکسن تجاری این بیماری به روش غیر فعال نمودن عامل بیماری با استفاده از روش متداول (غیر فعال سازی با حرارت) در ابتدا در ماهی گوپی به عنوان مدل آزمایشگاهی و سپس در ماهی Acipenseridae گونه Acipencer persicus به عنوان مدل واقعی جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری مهلک در منطقه دریای خزر پرداخته شد. این روش برای اولین بار در کشور و در مورد ماهیان خاویاری در جهان برای نخستین بارصورت گرفت. با توجه به آمار بالای بچه ماهیان رها شده و ضریب پایین بازگشت بچه ماهیان خاویاری می توان به اهمیت ایمنی زایی بچه ماهیان قبل از رها سازی پی برد تا شاهد افزایش جمعیت این ماهیان ارزشمند باشیم. بیماری نکروز عصبی ویروسی در ماهیان اقتصادی وحشی دریای خزر در حال گسترش است. ماهی خاویاری یکی از گونه های اقتصادی دریای خزر است. با توجه به مطالب بالا و توسعه روز افزون پرورش ماهی در قفس و احتمال سرایت این بیماری از ماهیان وحشی به ماهیان پرورشی، اهمیت ساخت واکسن موثر علیه این بیماری را دوچندان می کند. تا کنون در کشور هیچگونه واکسن تحقیقاتی برای این سروتیپ ساخته نشده است و واکسن تجاری موثری نیز برای این بیماری در حال حاضر در جهان در دسترس نمی باشد. اهداف اصلی ساخت این واکسن شامل موارد ذیل بود:

۱. ساخت واکسن موثر علیه بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) در ماهیان دریایی با هدف ویژه ماهیان خاویاری به عنوان یک گونه حساس به این بیماری در کشور به روش غیر فعال نمودن با روش های متداول(غیر فعال سازی با حرارت) با استفاده از ادجوانت های مفید و موثر

۲. ارزیابی اثر بخشی و ایمنی زایی آن در بچه ماهیان خاویاری به عنوان مدل آزمایشگاهی

در انجام این تحقیق روش های آزمایشگاهی مهمی همچون: کشت سلول، سرولوژی، (ELISA) ، هماتولوژی، آسیب شناسی و بافت شناسی، ایمونوهیستوشیمی IHC ، روش های مولکولی همچون Nested-RT-PCR، Real time RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت و نتایج کار بسیار رضایت بخش بوده و اطلاعات دریافتی نشانگر آن بود که واکسن تولید شده در سطح آزمایشگاهی توانائی ارتقای سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت در ماهیان مورد آزمایش را در مقابل سوش حاد بیماری دارا می باشد.

کلمات کلیدی: واکسن، نکروز عصبی ویروسی، ماهی گوپی، ماهی خاویاری، سیستم ایمنی، دریای خزر، ایران