

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

ارزیابی بیماریهای خاص در جمعیت‌های  
مورد مطالعه قزل آلای رنگین کمان

مجری مسؤل:

سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا

شماره ثبت

۵۸۹۳۴

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

---

عنوان طرح: ارزیابی بیماریهای خاص در جمعیت های مورد مطالعه قزل آلاهی رنگین کمان  
کد مصوب: ۹۴۰۰۲-۹۴۰۱-۰۰۲-۱۲-۱۲-۱۴۸

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا  
نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) : سید محمد  
ابراهیم جلیل ذریه زهرا

نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان استانی: -

نام و نام خانوادگی همکار(ان): -

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مصطفی اخلاقی، عیسی شریف پور

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا:

تاریخ شروع: ۹۴/۱۰/۱

مدت اجرا: ۲ سال و ۶ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال 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: ارزیابی بیماریهای خاص در جمعیت های مورد مطالعه

قزل آلالی رنگین کمان

کد مصوب: ۹۴۰۰۲-۹۴۰۱-۹۴۰۲-۰۰۲-۱۲-۱۲-۱۴۸-۰۱

شماره ثبت (فروست): ۵۸۹۳۴ تاریخ: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سیدمحمدجلیل ابراهیم ذریه زهرا  
دارای مدرک تحصیلی دکتر تخصصی در رشته بهداشت و  
بیماری های آزیان می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آزیان در

تاریخ ۱۳۹۹/۱۱/۵ 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- مروری بر آبی پروری جهانی (با تاکید بر پرورش قزل آلی رنگین کمان)		۳
۱-۲- مروری بر وضعیت آبی پروری		۶
۱-۲-۱- در ایران		۶
۱-۳- جایگاه پرورش قزل آلی رنگین کمان در آبی پروری کشور		۷
۱-۴- تکثیر و پرورش ماهیان سردابی در سال ۱۳۹۸		۹
۱-۴-۱- پرورش ماهیان سردابی		۹
۱-۴-۲- تکثیر ماهیان سردابی		۱۶
۱-۵- مشکلات و محدودیت ها در توسعه پرورش قزل آلا در کشور		۳۳
۱-۵-۱- مشکلات و چالش های موجود در زمینه تکثیر و پرورش قزل آلا		۳۴
۱-۶- تعریف موجودات عاری از بیماری خاص (SPF)		۴۱
۱-۷- پاتوژنهای اختصاصی نیازمند ایجاد گله SPF در ماهی قزل آلی رنگین کمان		۴۱
۱-۸- چگونگی تولید گله های SPF در آبزیان		۴۳
۱-۹- اهمیت بیماری های ویروسی در توسعه آبزیان		۴۳
۱-۱۰- اهمیت و ضرورت تحقیق		۴۴
۱-۱۱- اهداف طرح		۴۶
۱-۱۲- فرضیه/سوالات طرح		۴۷
۲- کلیات		۴۸
۱-۲- آزاد ماهیان: Salmonidae		۴۸
۱-۱-۲- خصوصیات آزاد ماهیان		۴۸
۲-۲- قزل آلی رنگین کمان		۴۸
۱-۲-۲- بیماریهای ماهی قزل آلی رنگین کمان		۵۰
۲-۲-۲- تشخیص و درمان بیماری قزل آلی رنگین کمان		۵۰
۳-۲- انواع بیماری های قزل آلی رنگین کمان		۵۰
۱-۳-۲- بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS) Viral Hemorrhagic Septicemia		۵۱
۲-۳-۲- بیماری نکروز عفونی پانکراس (IPN) Infection Pancreatic Necrosis		۵۳
۳-۳-۲- بیماری ویروسی نکروز عفونی بافت خونساز IHN		۵۸

۳-مروری بر منابع	۶۲
۳-۱-تاریخچه ویروس شناسی آبزبان	۶۲
۴-مواد و روش ها	۶۵
۴-۱-مواد	۶۵
۴-۱-۱-مواد مصرفی	۶۵
۴-۱-۲-لوازم غیر مصرفی	۶۵
۴-۲-روش کار	۶۶
۴-۲-۱-مکان و زمان نمونه برداری ها	۶۶
۴-۳-انجام آزمایش های مورد نظر	۷۸
۴-۳-۱-کشت سلول	۷۸
۴-۳-۲-آزمایش آنتی بادی درخشان غیر مستقیم (IFAT) بر روی کشت سلولی	۸۱
۴-۳-۳-آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR	۸۱
۴-۴-استخراج RNA و ساخت cDNA	۸۵
۴-۵-طراحی پرایمرهای Real-Time و سفارش ساخت آنها	۸۶
۴-۶-انجام PCR با گراداینت دمایی جهت دستیابی به دمای Annealing مناسب برای هر جفت پرایمر	۸۷
۴-۷-اپتیم کردن شرایط تکثیر هر جفت پرایمر از طریق رسم منحنی استاندارد	۸۸
۴-۸-اختصاصی بودن، تکرار پذیری واکنش های Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین	۸۹
۴-۹-کنترل آلودگی Real-time PCR	۹۰
۴-۱۰-انجام واکنش یک مرحله ای Real-time PCR	۹۰
۴-۱۱-آنالیز داده ها	۹۱
۴-۱۲-انجام آزمایشات خونشناسی	۹۱
۴-۱۳-انجام آزمایشات سرم شناسی	۹۱
۴-۱۴-اندازه گیری فعالیت لیزوزیم	۹۲
۴-۱۵-آنالیز آماری	۹۳
۵-نتایج	۹۴
۵-۱-مشاهدات بالینی و کالبد گشایی	۹۴
۴-۱۶-آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم	۱۰۰
۴-۱۶-۱-RT-PCR	۱۰۱
۴-۱۷-نتایج بررسی کیفی و کمی RNA	۱۰۴
۴-۱۸-نتایج حاصل از بررسی کیفیت cDNA های ساخته شده با پرایمرژن مرجع	۱۰۵

۱۰۶	..... Real-time PCR واکنش
۱۰۷	..... VHS نتایج ارزیابی روش Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس
۱۰۹	..... IHN نتایج ارزیابی روش Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس
۱۱۰	..... IPN نتایج ارزیابی روش Real-Time PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس
۱۱۱	..... Real-Time PCR یک مرحله ای
۱۱۶	..... نتایج
۱۱۶	..... ۱-۲۴-۴ نتایج نمونه برداری قبل از تکثیر
۱۱۸	..... ۲-۲۴-۴ نتایج نمونه برداری در زمان تکثیر
۱۲۰	..... ۳-۲۴-۴ نتایج نمونه برداری بعد از زمان تکثیر
۱۲۲	..... بحث
۱۳۷	..... ۶- نتیجه گیری نهایی
۱۳۸	..... پیشنهادها و راههای کنترلی
۱۴۱	..... چکیده انگلیسی

## چکیده

با عنایت به نیاز آحاد جامعه به مواد پروتئینی و نقش بی بدیل پروتئین های با منشا آبزیان در حفظ و بقای سلامتی جامعه از یکسو و روند توسعه پرورش ماهی قزل آلائی رنگین کمان در کشور و ضرورت دستیابی به مولدین عاری از بیماری های خاص و به منظور پایداری تولید، از سوی دیگر، ضرورت ایجاد مرکز تولید مولد SPF در کشور اجتناب ناپذیر است. در این راستا یکی از مهمترین عوامل اثر گذار بر تولید و توسعه پایدار آبی-پروری در کشور، مقوله مدیریت بهداشتی مطلوب و رخداد بیماریهای گوناگون و متعاقب آن تلفات و خسارات اقتصادی ناشی از وقوع آنها در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان است. امروزه در دنیا در آبزیان، تولید نتاج عاری از عوامل بیماریزای خاص یا SPF (Specific pathogen free) به عنوان ابزاری مهم در جهت کاهش خسارات اقتصادی ناشی از بیماریها شناخته شده است. در این بررسی تلاش شده است تا نظر به اهمیت بیماری های اخطارکردنی (Notifiable) و تاثیر آن بر وضعیت بهداشتی و خسارات های احتمالی ناشی از وقوع و شیوع آنها در جمعیت های مختلف آبزیان و با عنایت به تاکید سازمان های بهداشتی بین المللی همچون (OIE) و با استفاده از پروتکل های بین المللی و منابع علمی روز بخصوص تاکید بر آخرین پروتکل های سازمان (OIE) بیماری های اخطارکردنی (Notifiable) مورد نظر در کلیه جمعیت های مورد مطالعه طرح کلان مورد پایش دقیق بهداشتی قرار گیرد و بر این اساس از جدید ترین و پیشرفته ترین روش های تشخیص بیماری های خاص بهره گرفته شد. روش های نمونه برداری، برآورد حجم نمونه ها، روش های تشخیص و نیز روش های تأیید تشخیص همگی بر اساس جدید ترین پروتکل های رسمی سازمان OIE بود. در این راستا تلاش بر آن بود که مهمترین بیماری های اخطارکردنی ویروسی همچون IPN, IHN and VHS در مزارع سردابی منتخب و نیز سایت اصلی SPF در مرکز تنکابن مورد اولویت اصلی قرار گیرد و بر همین مبنا ساختار اصلی طرح پایش بهداشتی مورد تصویب قرار گرفته و به اجرا درآمد. در این طرح پایش بهداشتی، سه بیماری مهلک و اخطارکردنی سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS)، نکروز عفونی بافت خونساز (IHN) و نکروز عفونی پانکراس (IPN) که در ایران علت عمده مرگ و میر ماهیان قزل آلائی پرورشی هستند. برای انتخاب جمعیت های مولدین سالم به منظور تولید بچه ماهیان قزل آلائی عاری از بیماری (SPF) به روش های کشت سلول، RT-PCR و آنتی بادی درخشان غیر مستقیم در کارگاههایی که سابقه بیماری نداشتند و مورد تایید سازمان دامپزشکی بودند، موارد مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی هفت جمعیت سالم تشخیص داده شد و به مرکز پایش قرنطینه انتقال یافت. از بین مزارع مورد بررسی سه کارگاه آلوده به IHN و یک کارگاه آلوده به VHSV و IPNV تشخیص داده شدند که از میان مزارع منتخب حذف گردیدند. در ادامه در بخش قرنطینه مرکز SPF پیش از شروع تکثیر، در فصل تکثیر و در بچه ماهیان تولید شده پایش بیماری های مذکور انجام گرفت و یک جمعیت آلوده VHS پیش از شروع تکثیر حذف شد. یکی دیگر از اهداف اجرای این طرح، شناسایی عوامل مختلف بیماریهای ویروسی در مزارع پرورش قزل آلائی رنگین کمان در کشور و نیز استفاده از روش Real-Time PCR به منظور تشخیص سریع و دقیق

بیماری‌های ویروسی شایع در جمعیت ماهیان نگهداری شده در طرح کلان ملی SPF بود. نتایج پژوهش حاضر با استفاده از آزمایش ماهیان سالم و مشکوک به بیماری‌های ویروسی با استفاده از بررسی‌های انجام شده به روش Real-Time PCR در مراحل اجرای این طرح ملی نشان داد که این روش قابلیت شناسایی سریع ویروس‌های بیماریزا در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را دارا می‌باشد، بطوریکه از آن می‌توان بعنوان روش مکمل در ادامه آزمایشات کشت بافت و هم‌بعنوان روش تشخیصی سریع در آزمایش‌های غربالگری استفاده نمود. پس از انجام آزمایش‌های مولکولی نتایج آلودگی مزارع به هر یک از سه ویروس، سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی (VHS)، نکروز عفونی پانکراس (IPN)، بیماری عفونی بافت‌های خونساز (IHN) مشخص شد. بر اساس بررسی‌های و انجام مطالعات همه‌گیرشناسی و اکوآپی ژئوتیک در خصوص بیماری‌های اختطاردنی در این طرح ملی چنین استنباط می‌شود که افزایش امنیت زیستی در مزرعه پیش‌مولد تفاوت معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) بر افزایش ایمنی اختصاص و آنتی‌بادی سرم ماهیان نداشته است و این شاخص در ماهیان مراکز مختلف از میزان نسبتاً برابری برخوردار است. البته شاخص لیزوزیم به عنوان شاخص ایمنی غیر اختصاصی در مزرعه پیش‌مولد سایت اصلی مرکز SPF از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده که می‌تواند دلالت بر این نکته داشته باشد که ارتقا سطح ایمنی زیستی می‌تواند باعث کاهش استرس و تغییر مسیر انرژی به سمت عملیات پرورشی هدایت شود. همچنین نتایج نمونه برداری پس از فصل تکثیر نشان داد که عمده شاخص‌های اندازه‌گیری شده و حتی اندازه ماهیان سایت اصلی مرکز SPF در تنکابن بطور معنی‌داری بیشتر از ماهیان مزارع منتخب بوده است. براساس نتایج حاصل از این بررسی به نظر میرسد شرایط نگهداری، مدیریت تغذیه، پرورش و بهداشت در مرکز SPF مزبور به نوعی بوده است که سبب شده در روند اجرای کار، بتدریج ماهیان نگهداری شده در این مرکز در مقایسه با گله مشابه در مزارع منتخب و براساس شاخص‌های اندازه‌گیری شده از وضعیت سلامت بهتری برخوردار باشند.

**کلمات کلیدی:** قزل‌آلای رنگین‌کمان، بیماری‌های ویروسی، مولدین اولیه، شاخص سلامت، ماهیان SPF،

Real-Time PCR، VHS، IHN، IPN