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

**عنوان:**

# تشخیص بیماریهای ویروسی اخطارکردنی در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از روش Real-Time PCR

**مجری مسئول:**
**سیدمحمد ابراهیم جلیل ذریه‌زهرا**

**شماره ثبت**
**۵۸۴۴۵**

**وزارت جهاد کشاورزی**
**سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی**
**موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی**

---

**عنوان طرح/پروژه: تشخیص بیماریهای ویروسی اخطارکردنی در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از روش Real-Time PCR**
**کد مصوب: ۹٤۰۰۲۵-۹٤۰۰۲-۹٤۰۱-۰۱٤-۱۲۱۸-۱۲-۱۳٤۸**
**نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سیدمحمد ابراهیم جلیل ذریه‌زهرا**
**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 مجریان استانی: مهتاب یارمحمدی (موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر)، سید داود حسینی (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی)**
**نام و نام خانوادگی همکار(ان): ابولفضل سپهداری، محمد پورکاظمی، محدث قاسمی، محمدعلی یزدانی ساداتی، رضوان اله کاظمی، علیرضا شناور ماسوله، محمدرضا مهرابی، بابک رمضانی عاقله**
**نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -**
**نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -**
**محل اجرا: استان گیلان**
**تاریخ شروع: ۱۳۹٤/۱۰/۱**
**مدت اجرا: ۲ سال و ٦ 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 : تشخیص بیماریهای ویروسی اخطارکردنی در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از روش Real-Time PCR**

**کد مصوب : ۹٤۰۰۲۵-۹٤۰۰۲-۹٤۰۱-۰۱٤-۱۲۱۸-۱۲-۱۳٤۸**

**شماره ثبت (فروست) : ۵۸٤٤۵ تاریخ : ۱۳۹۹/۸/۱۰**

**با مسئولیت اجرایی جناب آقای سیدمحمد ابراهیم جلیل ذریه‌زهرا دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان می‌باشد.**

**پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۳۹۸/۱۱/۶ 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 ..... ۲
۱-۱- اهمیت و ضرورت تحقیق ..... ۳
۱-۲- اهداف تحقیق ..... ۵
۱-۳- کلیات ..... ۵
۱-۳-۱- آزاد ماهیان: SALMONIDAE ..... ۵
۱-۳-۲- قزل آلای رنگین کمان ..... ۶
۲- مروری بر منابع ..... ۱۵
۳- مواد و روش ها ..... ۱۸
۳-۱- نمونه برداری ..... ۱۸
۳-۲- استخراج RNA و ساخت CDNA ..... ۲۱
۳-۳- طراحی پرایمرهای REAL-TIME و سفارش ساخت آنها ..... ۲۲
۳-۴- انجام PCR با گرادیانت دمایی جهت دستیابی به دمای ANNEALING مناسب برای هر جفت پرایمر ۲۳
۳-۵- اپتیمم کردن شرایط تکثیر هر جفت پرایمر از طریق رسم منحنی استاندارد ..... ۲۴
۳-۶- اختصاصی بودن، تکرار پذیری واکنش های REAL-TIME PCR با استفاده از سایبرگرین ..... ۲۵
۳-۷-کنترل آلودگیREAL-TIME PCR ..... ۲۶
۳-۸- انجام واکنش یک مرحله‌ای REAL-TIME PCR ..... ۲۶
۳-۹- آنالیز داده ها ..... ۲۷
۴- نتایج ..... ۲۸
۴-۱- نتایج بررسی کیفی و کمی RNA ..... ۲۸
۴-۲- نتایج حاصل از بررسی کیفیت CDNA های ساخته‌شده با پرایمرژن مرجع ..... ۲۸
۴-۳- راندمان واکنش REAL-TIME PCR ..... ۲۹
۴-۴- نتایج ارزیابی روش REAL-TIME PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس VHS ..... ۳۱
۴-۵- نتایج ارزیابی روش REAL-TIME PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس IHN ..... ۳۲
۴-۶- نتایج ارزیابی روش REAL-TIME PCR با استفاده از سایبرگرین در بیماری ویروس IPN ..... ۳۴
۴-۷- نتایج آزمایشات REAL-TIME PCR یک مرحله ای ..... ۳۴
۴- بحث، نتیجه گیری ..... ۳۷

۶- نتیجه گیری کلی..... ۴۱
منابع ..... ۴۲
چکیده انگلیسی..... ۴۶

## چکیده

طی سالهای اخیر به علت افزایش نیاز به بچه ماهی قزل آلا ناشی از توسعه و گسترش قابل توجه صنعت پرورش قزل آلا و با توجه به گزارشات ارائه شده، مشکلات و مسائل ناشی از بیماری در ماهیان قزل آلا در کشور بسیار جدی و نگران کننده است. با توجه به اطلاعات موجود و گزارش سه ویروس IHN، VHS و IPN به عنوان پاتوژن های بیماریزا در کشور، نیاز به دسترسی به اطلاعات در مورد روش های تشخیصی سریع و دقیق، پراکنش ویروس و انواع گروههای ژنی (genogroups) موجود در کشور است. به منظور جلوگیری از شیوع و انتقال ویروس ، نیاز به بررسی مولدین مشکوک به بیماری می باشد. در حال حاضر، روش پیشنهادی برای تشخیص بیماریهای ویروسی در کشور، جداسازی و کشت سلولی ویروس و متعاقب آن شناسایی ویروس با استفاده از روش الایزا و آنتی بادی ویروس و نیز استفاده از روش RT-PCR بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط OIE است. روش های مورد استفاده علیرغم دقت بالایی که دارند بسیار وقت گیر و پرهزینه میباشد و نیاز به آزمایشگاههای تخصصی دارد. هدف از اجرای این طرح، شناسایی عوامل مختلف بیماریهای ویروسی در مزارع پرورش قزل آلای 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 می باشد. نتایج پژوهش حاضر با استفاده از آزمایش ماهیان سالم و مشکوک به بیماری های ویروسی با استفاده از بررسی های انجام شده به روش Real-Time PCR نشان داد که این روش قابلیت شناسایی ویروس های بیماریزا در ماهیان قزل آلای رنگین کمان را دارا می باشد، بطوریکه از آن می توان بعنوان روش مکمل در ادامه آزمایشات کشت بافت و هم بعنوان روش تشخیصی سریع در آزمایشات غربالگری استفاده نمود.


**کلمات کلیدی** : قزل آلای رنگین کمان، بیماریهای ویروسی، Real-Time PCR، IPN، IHN، VHS