

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

عنوان:

**بررسی علل احتمالی ویروسی تلفات  
ماهیان کپور نقره ای و آمور پرورشی  
در استان گیلان**

مجری:

محدث قاسمی

شماره ثبت

۵۲۱۲۴

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

عنوان طرح/ پروژه: بررسی علل احتمالی ویروسی تلفات ماهیان کپور نقره ای و آمور پرورشی در استان گیلان

کد مصوب: ۹۶۱۶۸-۱۲-۷۳-۲

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 / مجریان : محدث قاسمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عیسی شریف پور، سیدجلیل ذریه زهرا، مصطفی شریف روحانی، شاپور کاکولکی، مهدی مرادی، شهرام بهمنش، سهراب دژندیان، جواد دقیق روحی، سمیه حقیقی کارسیدانی، حسن نظام آبادی، بابک رضائی عاقله، منیره فتید، محدثه احمدنژاد، مهرداد اصغر نیا، معصومه امینی، ابوالفضل سپهداری، جمال نجفی، فریدون چکمه دوز، علیرضا افراز، عباس نوری

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا: استان گیلان

تاریخ شروع: ۸۹/۱۰/۱

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۶

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 علل احتمالی ویروسی تلفات ماهیان کپور

نقره ای و امور پرورشی در استان گیلان

کد مصوب: ۹۶۱۶۸-۱۲-۷۳-۲

شماره ثبت (فروست): ۵۲۱۲۴ تاریخ: ۹۶/۵/۱۴

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محدث قاسمی دارای مدرک  
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان  
می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان  
در تاریخ ۱۳۹۵/۱۲/۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید  
گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت کارشناس در پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی  
مشغول بوده است.

چکیده .....	۱
۱- مقدمه .....	۳
۱-۱- کپور ماهیان (Cyprinidae) .....	۴
۱-۲- تاریخچه پرورش ماهی در ایران .....	۴
۱-۳- تاریخچه پرورش ماهیان گرم آبی در استان گیلان .....	۵
۱-۴- مهمترین گونه های کپور ماهیان پرورشی در ایران .....	۵
۱-۵- رابدو ویروس ها .....	۸
۱-۶- بیماری هرپس ویروس (KHV) Koi herpes virus disease .....	۲۸
۱-۷- بیماری رثو ویروسی ماهی آمور (GCRV) .....	۲۹
۲- مواد و روش کار .....	۳۰
۲-۱- مواد مصرفی .....	۳۰
۲-۲- لوازم غیر مصرفی .....	۳۱
۲-۳- روش کار .....	۳۱
۲-۳-۱- نمونه برداری و بررسی علائم بالینی ماهیان .....	۳۱
۲-۳-۲- کشت سلول .....	۳۴
۲-۳-۳- آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR .....	۳۷
۲-۳-۴- واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) .....	۴۱
۲-۳-۵- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمر اختصاصی KHV .....	۴۲
۲-۳-۶- آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرز (Nested-RT-PCR) با استفاده از کیت تجاری IQ2000 ( تایوان ) .....	۴۲
۲-۳-۷- انجام Nested-PCR .....	۴۴
۲-۳-۸- الکتروفورز محصول PCR و عسک برداری از ژل آگاروز .....	۴۴
۲-۳-۹- آزمایش آسیب شناسی بافتی .....	۴۵
۲-۳-۱۰- میکروسکوپ الکترونی .....	۴۶
۲-۳-۱۱- مطالعات بیماریزایی (Pathogenicity) .....	۴۶

صفحه	عنوان	« فهرست مندرجات »
۴۷.....	۱۲-۳-۲- کشت باکتری .....	
۴۸.....	۳- نتایج .....	
۴۸.....	۱-۳- مشاهدات بالینی .....	
۵۲.....	۲-۳- شرایط عمومی آب استخرها .....	
۵۴.....	۳-۳- کشت سلولی .....	
۵۸.....	۴-۳- آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم .....	
۶۰.....	۵-۳- RT-PCR و PCR .....	
۶۴.....	۶-۳- آسیب شناسی بافتی .....	
۶۷.....	۷-۳- مطالعات بیماریزایی (Pathogenicity) .....	
۶۷.....	۸-۳- آزمایشات باکتری شناسی .....	
۶۸.....	۴- بحث .....	
۷۲.....	پیشنهادها .....	
۷۴.....	منابع .....	
۷۸.....	چکیده انگلیسی .....	

## چکیده

توسعه پرورش ماهیان گرمابی در کشور همراه با واردات تخم چشم زده، مولدین و ماهیان زینتی و انتقال بچه ماهی و مولدین از استانی به استان دیگر موجب گسترش ناخواسته برخی بیماری ها شده است. بر اساس گزارش شیلات استان گیلان آمار تلفات ماهیان فیتوفاگک در تابستان ۱۳۸۹ نشان دهنده وقوع بیش از ۱۱۶۲ تن تلفات ماهیان فیتوفاگک بوده که ارزش ریالی آن بیش از بیست و سه میلیارد ریال می باشد که این میزان حدود ۴۰ میلیارد ریال در سال ۱۳۹۱ محاسبه گردید (آمار غیر رسمی شیلات استان گیلان). همچنین در برخی مزارع تلفات محدود تر ماهیان آموگزارش می شود. مجموعه علائم مشاهده شده و شدت تلفات، احتمال وجود بیماری های ویروسی مانند ویرمی بهاره کپور، بیماری هرپس ویروسی و بیماری رئوویروسی ماهی آموگزارش داد. در تحقیق حاضر ضمن مراجعه به مزارع استان گیلان در زمان بروز تلفات شدید طی فصل پرورش در سالهای ۹۱-۱۳۹۰، نمونه برداری از ۴۱۱ قطعه ماهی فیتوفاگک و آموگزارای علائم بالینی با محدوده وزنی ۵ تا ۲۳۰۰ گرم از ۸۳ مزرعه صورت گرفت. علائم بالینی در مزارع متفاوت بوده و در خونریزی های زیر جلدی در پهلوها، پایه باله ها یا در کل باله و قرمز شدن زیر شکم و روی سرپوش آبششی، آگروفتالمی خفیف، خونابه در محوطه شکمی (به رنگ های زرد، شفاف یا قرمز) و خونریزی های نقطه ای بر روی امعاء و احشاء و بیحالی در ماهیان فیتوفاگک و در برخی موارد زرد یا کمرنگ شدن کامل پوست مشاهده شد و در تعداد کمی از ماهیان آموگزارای علائم خونریزی های نقطه ای پوست و احشاء و آسیت (آب آوردگی) در محوطه شکمی و در برخی ماهیان فیتوفاگک و آموگزار نیز کبد و آبشش کمرنگ مشاهده گردید. در موارد معدودی حالت تورم و پختگی در عضلات ماهی فیتوفاگک دیده شد. در خصوص بچه ماهیان موارد متعددی از لاغری مفرط مشاهده شد. تفاوت در علائم بالینی می تواند نشانگر وجود علل متفاوت تلفات در مزارع مختلف باشد. رنگ آب در استخرهای دارای تلفات نیز تفاوت داشته و از کاملاً شفاف تا سبز زیتونی، زرد یا کمی قهوه ای متفاوت بود که نشان از اختلاف مدیریت کلی پرورش از جمله مدیریت کیفیت آب می باشد. حداقل عمق قابل مشاهده با صفحه سکشی در مزارع ۴۰ سانتی متر تا یک متر بود. استخرهایی که از منبع چاه نیمه عمیق یا عمیق به عنوان منبع آبی استفاده می کردند در مقایسه با آنها که از آب کانال و رودخانه بهره مند بودند تلفات بسیار کمتری داشتند. میانگین دمای آب، اکسیژن و pH در مزارع به ترتیب °C ۳۱-۲۶/۵، ۴/۳-۵/۷ mg/L و ۷/۴-۹/۳۸ بود. به منظور بررسی های ویروس شناسی، نمونه برداری از اندامهای داخلی شامل کلیه و طحال انجام شد و هوموژن بافت های هدف پس از گذراندن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون بر روی تیره های سلولی EPC و BF2 تلقیح گردید تا در صورت مشاهده اثرات آسیب سلولی مراحل تایید تشخیص به کمک روشهای آنتی بادی درخشان، RT-PCR و PCR انجام شود. در کشت سلولی، آثار تخریب سلولی مشکوک به بیماری SVC پس از تلقیح هوموژن بافتی ۳ ماهی فیتوفاگک بر روی تک لایه سلولی EPC بدست آمد ولی در پاساژهای بعدی علائم آسیب سلولی ایجاد نگردید. در خصوص نمونه های آموگزار نیز هیچگونه آثار آسیب سلولی بر روی دو تیره سلولی EPC و BF2 ایجاد نشد. در آزمایش آنتی

بادی درخشان غیر مستقیم نیز که ۷۲ ساعت پس از تلقیح هوموژن بافتی ماهی فیتوفاگک و آمور بر روی تک لایه سلولی EPC انجام شد، هیچگونه واکنشی مشاهده نگردید. در روش PCR و RT-PCR تمام نمونه‌های فیتوفاگک و آمور از نظر بیماری‌های SVC و KHV و نمونه‌های آمور از نظر وجود بیماری GCRV با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی آزمایش شدند. بعلاوه به طور همزمان از کیت‌های تجاری تشخیص SVC و KHV (IQ2000) استفاده شد. نتایج تمام آزمایشات PCR و RT-PCR حاکی از عدم وجود RNA رابدو ویروس کارپیو، رئوویروس و DNA هرپس ویروس کوی در نمونه‌های مورد آزمایش بود. به این ترتیب که در PCR دستی باند ۴۷۰ bp مربوط به SVCV، باند ۲۹۲ bp و باندهای ۶۹۷ bp و ۳۲۰ bp مربوط به GCRV در هیچیک از نمونه‌ها تایید نشد و به همین صورت در الکتروفورز محصول PCR مربوط به کیت‌های IQ2000 به ترتیب باندهای منفی ۴۷۱ bp و ۶۴۰ مشاهده شد و باندهای مثبت ایجاد نگردید. به منظور تایید نتایج، ۳ نمونه مشکوک به آزمایشگاه رفرانس اتحادیه اروپا ارسال گردید که هیچیک از بیماری‌های مذکور تایید نشد. به طور همزمان بر روی نمونه‌های ۲۶ کارگاه آزمایش تشخیص عوامل باکتریایی با کشت از بافت‌های کلیه و طحال بر روی آگار خوندار انجام شد. در آزمایشات کشت و بیوشیمیایی ۲۱ جدایه آئروموناس هیدروفیلا و ۶ جدایه جنس سودوموناس تشخیص داده شد در حالیکه از همان نمونه‌ها هیچگونه ویروسی تایید نگردید.

بر اساس نتایج کشت بر روی دو تیره سلولی و آزمایشات PCR، RT-PCR و IFAT حضور عوامل ویروسی SVC، KHV و GCRV در نمونه‌های مورد آزمایش در این تحقیق تایید نگردید و علت تلفات در بسیاری از مزارع مربوط به عوامل ویروسی نبوده و با مدیریت بهداشتی مزارع قابل کنترل و پیشگیری می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** کپور ماهیان، فیتوفاگک، آمور، بیماریهای ویروسی، SVC، KHV، GCHV