فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۰-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی ژن *گلیکوپروتئینی* ویروس سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) جداشده از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهار محال و بختیاری

حسین مومنی: عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، momeni_hossein_dvm@yahoo.com
فیروز فدایی فرد *: دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، fadaeifard@gmail.com
حسن ممتاز: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، hamomtaz@yahoo.com
منوچهر مومنی: عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، momeniman@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سپتی سمی هموراژیک ویروسی به‌عنوان جدی‌ترین بیماری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان درصنعت آبزی‌پروری شناخته شده است. در مطالعهٔ حاضر ژن *گلیکوپروتئینی* ویروس سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) شناسایی شد، و تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیکی برخی ویروس‌های جداشده از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های مشکوک به بیماری VHS که از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شده بود با استفاده از آزمون Reverse transcriptase PCR (RT- PCR) سنجش شد. در این میان هشت نمونه به‌عنوان سویهٔ مثبت شناسایی شد. در این تست، ژن *گلیکوپروتئینی* (G) ویروس ردیابی گردید و جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی تعیین توالی شد. نتایج حاصل از مقایسهٔ ردیف نوکلئوتیدی تعیین‌شده در این مطالعه با توالی شناخته‌شدهٔ ژن *گلیکوپرتئینی* سایر ویروس‌ها مطالعهٔ فیلوژنتیکی شد.

نتایج: نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر نشان داد که بین صفر تا ۷/۴ درصد تنوع ژنتیکی در ژن *گلیکوپروتئینی* وجود دارد و در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن *گلیکوپروتئینی* درآلمان (توالی EU708818) با ۱۰۰درصد تشابه و کمترین قرابت مربوط به جدایه‌های این ویروس در ژاپن (توالی AB672616) و ترکیه (توالی JF415091) هر کدام با ۹۲/۶۰ درصد قرابت مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به قرابت ژنتیکی ویروس‌های VHS جداشده از ایران با سویه‌های اروپائی به‌ویژه آلمان و فرانسه احتمال وجود ارتباط بین شیوع بیماری VHS ایران و تخم‌های چشم‌زدهٔ وارداتی از کشورهای ذکرشده وجود دارد .

واژه‌های کلیدی: ژن *گلیکوپروتئینی*(G)، ویروس VHS، آنالیز فیلوژنتیکی، RT-PCR

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

ویروس VHS یک پاتوژن رابدوویروسی ماهی است که از تهدیدات بزرگ صنعت آبزی‌پروری در دنیا به شمار می‌رود. این ویروس نه‌تنها در آزاد ماهیان، بلکه در اکثر گونه‌های ماهیان دریایی نیز باعث بیماری می‌شود (۱-۳). VHS از سوی سازمان OIE [۱] به عنوان بیماری‌های لیست‌شدهٔ مهم آزاد ماهیان معرفی شده است. دامنهٔ وسیع میزبانی و تفاوت‌های عمده در بیماری‌زایی در این میزبان‌ها باعث بروز مشکل در برنامهٔ کنترل VHS شده است (۴). تمام جدایه‌های ویروس را می‌توان به‌وسیلهٔ آزمایش‌های ایمنی شیمی و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلنال IP5B1 درحد ژنوتیپ و سروتیپ شناسایی کرد (۵ و ۱۰).

ویروس VHS متعلق به خانوادهٔ *رابدوویریده*[۲] و جنس *نوویرابدوویروس*[۳] است. ویریون عامل بیماری، فشنگی‌شکل و با قطر تقریبی ۷۰ نانومتر و طول ۱۸۰ نانومتر است. این ویروس یک RNA تک‌رشته‌ای دارد که تقریباً حاوی ۱۱۰۰۰ نوکلئوتید است و یک پوشش حاوی گلیکوپروتئین غشائی دارد که یک آنتی‌ژن سطحی خنثی‌کننده[۴] است. ژنوم ویروس شش پروتئین را به رمز در می‌آورد. این ویروس به اتر، حرارت و pH اسیدی (برابر یا کمتر از ۳) حساس و در مقابل pH برابر با ۵ تا ۱۰مقاوم است. تاکنون چهار ژنوتیپ I، II،III و IV برای این ویروس شناسایی شده است. ویروس در سیتوپلاسم سلول میزبان تکثیر می‌یابد و شش mRNA مونوسیسترونیک تولید می‌کند (۶). الایزا، خنثی‌سازی سرم[۵]، آنتی‌بادی درخشان، ایمونو پراکسیداز و تولید پلاک از آزمایش‌های سرم‌شناسی هستند که در ردیابی ویروس به کار می‌رود و RT-PCR از آزمون‌های مولکولی است. یکی از آزمون‌های جدید معرفی‌شده در پایش این ویروس در محیط‌های طبیعی و آزمایشگاهی، استفاده از تکنیک جدیدی از PCR به‌نام RT-PCR کمی[۶] است که در ردیابی سریع ماهیان قبل از تأیید از طریق کشت سلولی و به‌ویژه ردیابی ماهیانی که علائم بالینی بیماری را نشان نمی‌دهند کارایی بالایی دارد (۷).

ویروس VHS در اکثر مناطق اروپا به‌صورت بومی درآمده است و از پاتوژن‌های مهم مزارع پرورشی آب‌های شیرین و شور به شمار می‌رود. برخلاف ویروس IHN[۷]، بیماری ناشی از VHS در ماهیان قزل آلای بزرگ به‌صورت شاخص بروز می‌کند (۷).

با مطالعهٔ برخی ماهیان دریایی اطراف نروژ اعم از شگ‌ماهی اطلس[۸]، ماهی روغن[۹]، ماهی نرم‌باله[۱۰] و ماهی لب‌نقره‌ای[۱۱] ویروس VHS از طریق آزمون RT-PCR ردیابی مولکولی شد و پس از تعیین توالی نمونه‌های مثبت مشخص شد که تمامی نمونه‌ها متعلق به ژنوتیپ Ib است و آنالیز فیلوژنتیکی نیز نشان داد که جدایه‌های ویروسی مربوط به شگ‌ماهی اطلس و ماهی لب‌نقره‌ای خیلی نزدیک به هم هستند (۸). در یک مطالعه توالی پروتئین غیرساختمانی(NV) و پروتئین گلیکوپروتئینی جدایه های اروپایی و آمریکایی ویروس VHS تعیین شد و در محاسبهٔ درخت‌های فیلوژنتیکی از آن استفاده شد. براساس درصد مشابهت‌های آمینواسیدی یا نوکلئوتیدی جدایه‌های اروپایی و آمریکایی دو گروه ژنتیکی مشخص و جدا از هم تشکیل شد. جدایه‌های

آمریکای شمالی خوشه‌های گروه ژنتیکی هموژنی را تشکیل دادند ولی جدایه‌های اروپایی تغییرات ژنتیکی بالایی را از خود نشان دادند. تشکیل زیرگروه در این ویروس‌ها با توجه به همین تنوع می‌تواند با هر دو منشأ جغرافیایی و طبقه‌بندی سرولوژیکی در ارتباط باشد (۱).

در مطالعهٔ حاضر علاوه بر شناسایی ویروس VHS در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مشکوک به این بیماری، تعیین توالی نمونه‌های ویروس‌ها و همچنین تعیین قرابت فیلوژنتیکی آن‌ها با سایر ویروس‌های VHS دنیا انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقهٔ جغرافیایی: نمونه‌های مربوط به ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مشکوک به بیماری VHS در زمستان ۱۳۹۲ و از مزارع پرورشی استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. انتخاب مزارع براساس گزارش انجام‌شده از تلفات مشکوک به VHS انجام شد. اکثر نمونه‌ها از ماهیان درشت و با وزن بالای ۲۵۰ گرم برداشت شد. میانگین دمای آب مزارع پرورشی نیز بین ۷ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد بوده است. ماهیان مشکوک عموماً از علائمی نظیر تیرگی پوست، بیرون‌زدگی چشم، خونریزی روی پوست و خونریزی‌های منتشره داخل حفره شکمی برخوردار بوده‌اند. نمونه‌ها پس از برداشت درون جعبه یونولیتی قرار داده شده و در کنار یخ جهت تشخیص مولکولی به آزمایشگاه ارسال شد.

عملیات آزمایشگاهی: نمونه‌های ماهی پس از ورود به آزمایشگاه در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای تعیین میزان ارتباط ژنتیکی ژن *گلیکوپروتئینی* ویروس VHS با موارد جداشده از سایر کشورها ابتدا توالی 1523 نوکلئوتیدی ژن *گلیکوپروتئینی* با استفاده از پرایمرهای RT-PCR تکثیر شد. این پرایمرها براساس بلوک های آمینو اسیدهای محافظت‌شده بین توالی‌های *گلیکوپروتئینی* ویروس نکروز عفونی مراکز خون‌ساز(IHN) و ویروس VHS طراحی شده‌اند(۹). خصوصیات پرایمرهای به‌کاررفته در جدول ۱ آمده است. چنان‌که در آن پرایمر معکوس حاوی یک SstI در انتهای ′5 خود است که برای اهداف کلونینگ به کار می‌رود و پرایمر جلوبرنده شامل یک جایگاه برش برای آنزیم HindIII است.

جدول ۱- مشخصات زوج پرایمرهای به‌کاررفته در جستجوی ویروس VHS

توالی پرایمرها	اندازه باند(جفت باز)	ژن هدف	منبع
R- 5′ACACCTGAGCTCTTCTTTGGAGGGCAAACNATY3	1523	G	(۹)
F- 5′ TGCATGAAGCTTCAGTCCCCAGGGATGATGNCC3′			

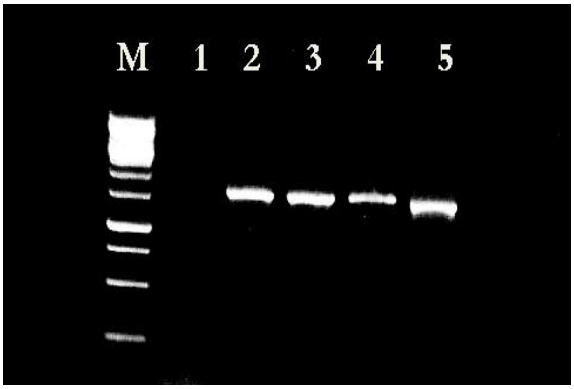
مراحل تشخیص مولکولی و انجام آزمون RT-PCR: جهت استخراج RNA از نمونه‌های مختلف از کیت Tripure ساخت شرکت Roche applied science طبق دستورالعملی که شرکت سازنده ارائه کرده، استفاده شد. برای ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استخراج‌شده در مرحلهٔ اول، پنج میکرولیتر از DEPC- water به‌همراه یک میکرولیتر از Random Hexamer و دو میکرولیتر از RNA مربوط به هر نمونه در یک لوله استریل مخلوط شد و به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه شد. پس از پنج دقیقه سردکردن لوله روی یخ، به مخلوط فوق پنج میکرولیتر M-Mulv RT buffer 5X، دو میکرولیتر dNTP 10 mM و یک میکرولیتر آنزیم M-Mulv RT اضافه شد و به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرارداده شد. همچنین جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر، از دستگاه (Eppendorf) Master Cycler gradient با حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، یک میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۰۰ میکرومول dNTP ، یک پیکومول از زوج پرایمرهای F و R ، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از cDNA مربوط به هر نمونه استفاده شد. برنامهٔ حرارتی استفاده‌شده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری(۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به‌مدت ۹۰ ثانیه) و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه. جهت تأیید وجود قطعات تکثیریافته، ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل یک درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در حضور نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورزشد.

تعیین ردیف نوکلئوتیدی: درمرحلهٔ بعد فرآوردهٔ حاصل ازPCR با کیت خالص‌سازیPCR (Roche Applied Science) و براساس توصیهٔ کارخانه سازنده (به شماره کیت ۱۱۶۶۷۱۵۷۰۰۱) خالص شد. محصول PCR تمامی نمونه‌های مثبت جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن تکثیریافته به شرکت Macrogen کشور کره ارسال و به‌روش Sequencing Method Sanger تعیین توالی شد.

تعیین قرابت نوکلئوتیدی: ردیف نوکلئوتیدی ژن *G* تعیین‌شده در این مطالعه با توالی شناخته‌شدهٔ این ژن در سایر کشورها در بانک ژنی NCBI با استفاده از نرم‌افزارClustal X و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence Identity Matrix، درخت فیلوژنی مربوطه رسم شد.

نتایج

ردیف نوکلئوتیدی ژن *G* ویروس سپتی سمی هموراژیک ویروسی مربوط به هشت نمونهٔ مثبت‌شده در آزمایش RT-PCR تحت توالی قرار گرفت و با استفاده از نرم‌افزار Clustal X با ردیف نوکلئوتیدی ثبت‌شدهٔ این ژن در بانک جهانی(NCBI) (ردیف دسترسی AJ487080)، قرابت فیلوژنتیکی آن مشخص شد. تصویر ژل مربوط به ردیابی این ژن در شکل ۱ و توالی نوکلئوتیدی مربوط به یکی از ایزوله‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

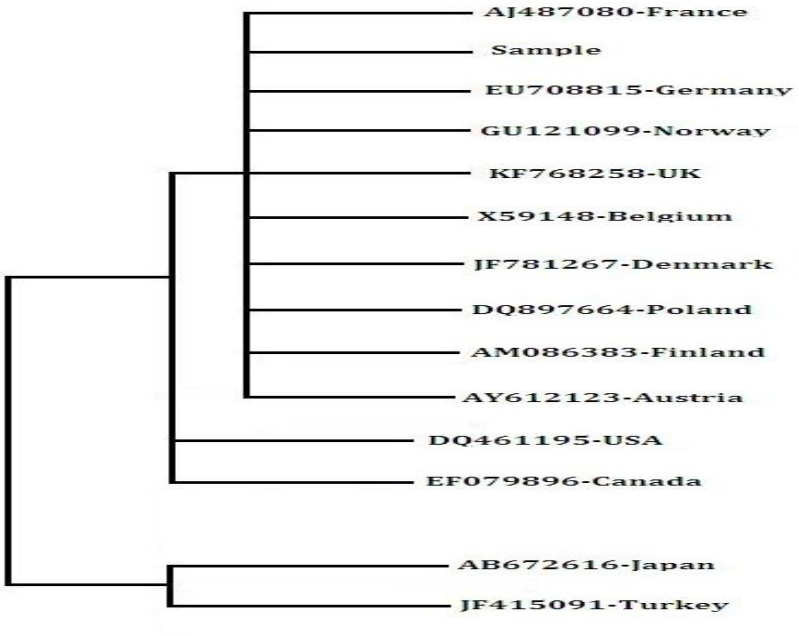


شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *G* ویروس سپتی سمی هموراژیک ویروسی (ستون M= نشانگر ۱۰۰جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۲ تا ۵= نمونه‌های مطالعه‌شدهٔ واجد قطعه ۱۵۲۳ جفت بازی)

پس از مشاهدهٔ شباهت‌ها و تفاوت‌های ردیف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار Njplot قرابت فیلوژنتیکی آن‌ها ترسیم شد که به‌ترتیب در شکل ۲ درخت فیلوژنتیکی آن به دست آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده ویروس‌های VHS شناسایی‌شده در سه دسته تقسیم شده‌اند که انواع اروپایی در یک دسته، دو ویروس مربوط به آمریکا و کانادا در یک دسته و دو ویروس مربوط به ژاپن و ترکیه نیز دسته سوم را تشکیل داده‌اند آنچه که در درخت ترسیم شده مشهود است استقرار نمونهٔ ایرانی در بین ویروس‌های اروپایی است. همچنین در جدول ۳ نیز مقایسهٔ میزان قرابت ژن *گلیکوپروتئینی* ویروس VHSدر ایران با سایر کشورها نشان داده شده است. در این جدول میزان قرابت ژنی ویروس‌های شناسایی‌شده با هم مقایسه شد و با توجه به اطلاعات موجود صفر تا ۷/۴درصد تنوع ژنتیکی در ژن *گلیکوپروتئینی* وجود دارد و در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن *گلیکوپروتئینی* در آلمان (توالیEU708818) با ۱۰۰درصد تشابه و کمترین قرابت مربوط به جدایه‌های این ویروس در ژاپن (توالیAB672616) و ترکیه (توالیJF415091) هرکدام با ۹۲/۶۰درصد قرابت مشاهده شد.

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی ژن *G* ویروس سپتی سمی هموراژیک ویروسی مربوط به یکی از نمونه‌های مثبت‌شده در آزمایش RT-PCR

TTCTTTNNANGACAAACCATTNAAAANACCATCCTNNAANCAAAGCTGTCCCGTCAANAGNCCACCAATNANGC
CGGCAANNATCACNANTACCCNTTCTTCCCCNAACCTTCCTNCATCTNNATNAAGGACAATGTCCACAANGACA
TAACCCACTATTACAAGACCCCAAANACAGTGTCCATCNATCTCTACANTAGAAAGTTTCTAAACCCTGACTTCA
TANANNNNNTCTNTACAACATCACCCTNTCCAACCCACTNGCAAGNAGTCTACTGGATCGGCGCCACACCTCAG
GCCCATTNCCCCACCTCANAAACNCTTNAGGNNCATCTNTTCACCANGACACATGATCACAGGGTTGTCAAGGC
AATCNTANCNNNTCACCACCCCTNNGGACTCACAATNNCATNCACGGTGACATTTTGTGGGGCAGAATGGATCA
AGACCGACCTNNNNNACCTTATTAANNTGACAGGACAGGNNGGNNCNAANAAACTNTCTCCAANNAANTNTNT
CAACACCNACATTCANATNAGGGGAGCCACAGACGACTTCTCTTACCTTAACCATCTCATCACCAACATGGCTC
AAAGGACTNANTNCCTNNACNCCCACANTNATATCACTNCCTCTNNNAANATCTCCTCTTTTCTCCTCTCAAANT
TTCNTCCCANTCACCCNGGCCCGGGCAAGGCACACTATCTCCTTGATGNCCANATCA



شکل ۲- درخت فیلوژنی مربوط به آنالیز ردیف نوکلئوتیدی ژن *گلیکوپروتئینی* ویروسVHSدرایران با تعدادی از توالی‌های ثبت‌شدهٔ این ژن در بانک جهانی

جدول ۳- نتایج حاصل از مقایسهٔ ردیف نوکلئوتیدی ژن *گلیکوپروتئینی* ویروس VHSدرایران با تعدادی از توالی‌های ثبت‌شده این ژن در بانک جهانی (Sequence Identify Matrix)

Seq	Sample	AJ487080-France	EU708818-Germany	GU121099-Norwey	KF768258-UK	X59148-Belgium	JF781267-Denmark	DQ897664-Poland	AM086383-Finland	AY612123-Austria	DQ461195-USA	EF079896-Canada	AB672616-Japan	JF415091-Turkey
Sample	ID	0.999	1	0.989	0.987	0.991	0.953	0.962	0.932	0.941	0.928	0.92	0.926	0.926
AJ487080-France	0.999	ID	0.999	0.987	0.988	0.986	0.95	0.966	0.936	0.94	0.929	0.918	0.924	0.923
EU708818-Germany	1	0.999	ID	0.992	0.986	0.993	0.927	0.964	0.932	0.944	0.93	0.916	0.922	0.923
GU121099-Norwey	0.989	0.987	0.991	ID	1	0.998	0.983	0.979	0.976	0.973	0.967	0.937	0.952	0.954
KF768258-UK	0.987	0.988	0.986	1	ID	0.999	0.985	0.981	0.978	0.981	0.966	0.934	0.958	0.959
X59148-Belgium	0.991	0.986	0.993	0.998	0.999	ID	0.98	0.983	0.969	0.98	0.964	0.929	0.961	0.962
JF781267-Denmark	0.953	0.95	0.957	0.983	0.985	0.98	ID	0.986	0.992	0.991	0.985	0.983	0.976	0.984
DQ897664-Poland	0.962	0.966	0.964	0.979	0.981	0.983	0.986	ID	0.99	0.993	0.984	0.979	0.98	0.983
AM086383-Finland	0.932	0.936	0.932	0.976	0.978	0.969	0.992	0.99	ID	1	0.982	0.969	0.983	0.986
AY612123-Austria	0.941	0.94	0.944	0.973	0.981	0.98	0.991	0.993	1	ID	0.985	0.97	0.986	0.989
DQ461195-USA	0.928	0.929	0.93	0.967	0.966	0.964	0.985	0.984	0.982	0.985	ID	0.975	0.99	0.991
EF079896-Canada	0.92	0.918	0.916	0.937	0.934	0.929	0.983	0.979	0.969	0.97	0.975	ID	0.993	0.989
AB672616-Japan	0.926	0.924	0.922	0.952	0.958	0.961	0.976	0.98	0.983	0.986	0.99	0.993	ID	0.994
JF415091-Turkey	0.926	0.923	0.923	0.954	0.959	0.962	0.984	0.983	0.986	0.989	0.991	0.989	0.994	ID

بحث و نتیجه‌گیری

اولین گزارش جداسازی و شناسایی این ویروس در سال ۱۹۶۲ به‌عنوان عامل بیماری شایع ویروسی از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان دانمارک صورت پذیرفت و در سال ۱۹۶۵ عملیات ریشه‌کنی آن در این کشور انجام شد و بعد از آن از اکثر کشورها گزارش شد (۱۱). در دهه‌های اخیر انتشار آن در اکثر مناطق دنیا و همچنین ماهیان دریایی به‌ویژه در نیم‌کرهٔ شمالی انجام شده است. VHS عموماً به‌عنوان یک بیماری ویروسی مهم در پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان اروپا محسوب می‌شود و تا سال ۱۹۸۹ عموماً از آزاد ماهیان آب شیرین جدا شده است اما در دهه‌های اخیر از تعداد زیادی از گونه‌های ماهیان دریایی جداسازی شده است. در ابتدا این بیماری تحت عناوین مختلفی از جمله تورم کلیه و فاسدشدن کبد، طاعون قزل آلا[۱۲] و بیماری اگتود[۱۳] خوانده می‌شد (۶ و ۱۲). ژنوم ویروس VHS دارای شش ژن است که شش نوع پروتئین مختلف را به رمز در می‌آورد یکی از این پروتئین‌ها غیرساختمانی(Nv) است و عملکرد ناشناخته ای دارد و پنج تای دیگر انواع ساختمانی *نوکلئوکپسید*(N)، *فسفوپروتئین*(P)، *ماتریکس پروتئین*(M)، *گلیکوپروتئین*(G) و *RNA پلیمراز پروتئین*(R) هستند. این ژن‌ها در توالی '-N-P-M-G-3'Nv-L-5 مرتب می‌شوند (۳). ثابت شده که پروتئین **G** به‌عنوان مولکول هدف برای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و محافظتی به شمار می‌رود؛ البته این از ویژگی‌های سایر رابدوویروس‌ها نیز به شمار می‌رود(۱۳).

مطالعات فیلوژنتیکی قبلی بر روی جدایه‌های ویروس VHS وجود گروه‌های ژنتیکی مجزا را نشان می‌دهد. هرچند گمان می‌رود که ارتباط نزدیکی بین جدایه‌های آب شیرین و دریایی تاکنون مشاهده نشده باشد؛ مطالعات اخیر نشان از ارتباط نزدیک بین جدایه‌های VHS آب شیرین و دریایی اروپا دارد. مطالعهٔ تنوع سکانس‌های ژن *گلیکوپروتئینی* (**G**) این احتمال را فراهم ساخته که در اروپا سه ژنوتیپ I،II و III از این ویروس وجود داشته باشد. طی مطالعه بر خصوصیات مولکولی سویهٔ دریاچه‌های بزرگ ویروس VHS**(**MI03GL**)** و روابط فیلوژنتیک آن با جدایه‌های اروپایی و آمریکای شمالی از طریق همولوژی توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی نشان دادند که ویروس دریاچه‌های بزرگ با سویه‌های ژاپنی JF00Ehi1 تا ۹۶درصد و KRRV9822 تا ۹۵درصد ارتباط نزدیک دارند. در بین سایر نوی رابدوویروس‌ها، ویروس VHS دارای بالاترین همولوژی نوکلئوتیدی (۶۲درصد) با رابدوویروس سرماری[۱۴] است (۶).

توالی‌های RNA قابلِ‌دسترس ژن‌های *گلیکوپروتئینی*(G)، *نوکلئوپروتئینی* (N) و *غیر ویریونی* (NV) ویروس VHS با حداکثر مشابهت[۱۵] و روش‌های تحلیل بیزیان[۱۶] بررسی شد. درخت‌های فیلوژنتیکی به‌دست‌آمده از گونه‌های این ویروس تا حد زیادی با هم مشابه بود و مشخص شد که گونه‌های مشخص I تا IV مونوفیلتیک متقابل هستند. به نظر می‌رسد که ویروس VHS از یک منشأ دریایی در اقیانوس اطلس شمالی منشأ گرفته شده باشد که در ۲۶۷ تا ۶۹۷ سال پیش به دو دسته تقسیم شده‌اند. چنان‌که سویه IV در آمریکای شمالی و سویه‌های I، II و III در منطقهٔ شمال شرقی اطلس(اروپا) متمرکز شده‌اند. سویهٔ IV نیز خود به سه زیرگونهٔ مونوفیلتیک *IVa*، *IVb* و *IVc* متمایز می‌شود؛ چنان‌که *IVa* موجب آلودگی آزاد ماهیان شمال شرقی اقیانوس آرام و بسیاری از ماهیان دریایی می‌شود،

زیرگونهٔ *IVb* باعث بروز بیماری‌های اندمیک در دریاچهٔ بزرگ آب شیرین شد و زیرگونهٔ *IVc* جدیداً در آب‌های دریایی اطلس شمالی شناسایی شده است (۱۴).

همچنین به‌منظور مطالعهٔ تکامل ژنتیکی ویروس VHS، ژن *G* کامل از ۷۴ جدایه بررسی شد. مطالعهٔ ویروس VHS در گونه‌های متعدد ماهیان دریایی نشان می‌دهد که دارای یک جد مشترک هستند. براساس میزان تخمین جایگزینی نوکلئوتیدی[۱۷]، اجداد تمام جدایه‌های آب شیرین اروپایی به ۵۰ سال پیش بر می‌گردد. این یافته متناسب با گزارش‌های اولیه در سال ۱۹۵۰ بر مشاهدات بالینی VHS در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان آب شیرین دانمارک است. همچنین مطالعهٔ ذکرشده نشان می‌دهد که ویروس VHS دریایی اروپا و خط دریایی آمریکای شمالی تقریباً در ۵۰۰ سال پیش از هم جدا شده‌اند. اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه نیز فرضیهٔ اینکه محیط‌های دریایی مخزن اصلی و ریشه‌ای ویروس هستند را تقویت می‌کنند و تغییر در دامنه میزبانی (از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان) ممکن است چندین بار اتفاق افتاده باشد؛ لذا ویروس موجود در محیط‌های دریایی به‌عنوان تهدیدی برای صنعت پرورش قزل‌آلا به شمار می‌رود (۱۵). تمام جدایه‌های ویروسی VHS به‌دست‌آمده از ماهیان دریایی طی چالش داخل آب قادر به ایجاد بیماری یا تلفات در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نبودند (۱۶).

به‌دنبال تحقیق بر ویروس VHS، توالی‌های نوکلئوتیدی منطقهٔ اختصاصی ژن *گلیکوپروتئینی* این ویروس در بین ۶۳ سویهٔ از ویروس جداشده از ماهیان فرانسه در سال‌های ۱۹۷۱ تا ۱۹۹۹ مقایسه شد. توالی‌های اکثر جدایه‌ها غیر از یک جدایه که در بچه مارماهی شناسایی شده بود و اختلاف بالایی در مقایسه با سایر جدایه‌های فرانسوی داشت یکسان بود. آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ویروس VHS به‌جز L59X متعلق به ژنوتیپ I است که قبلاً به‌عنوان سویه‌های ویروسی جداشده از قارهٔ اروپا معرفی شده‌اند.در کل نتایج این تحقیق نشان از همبستگی بین منشأ جغرافیایی جدایه‌های مطالعه‌شده و خصوصیات ژنتیکی آن‌ها داشت (۱۷).

در سال‌های اخیر و به‌دنبال افزایش تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشورمان از طرفی و کمبود بچه‌ماهی لازم برای تأمین این حجم ماهی خوراکی از طرف دیگر، مدیران و مسؤلان بخش‌های دولتی مرتبط با این موضوع را مجبور به واردات گستردهٔ تخم چشم‌زده از کشورهای دیگر به‌ویژه فرانسه، دانمارک، نروژ، آمریکا و... کرد که در کنار این واردات حجیم علی‌رغم اعلام سالم‌بودن آن‌ها از طرف کشور واردکننده و معاینه توسط بخش‌های قرنطینه‌ای سازمان دامپزشکی، نگرانی آلوده‌بودن تخم‌ها به عوامل عفونی به‌ویژه ویروس‌های بیماری‌زا همچون VHS، IPN [۱۸] و IHN می‌رفت؛ چنان‌که در سال‌های گذشته بچه ماهیان قزل‌آلای کشور با بیماری IHN مواجه شدند و تلفات بالایی را تجربه کردند و در سال ۱۳۹۲ نیز متأسفانه اکثر مزارع پرورشی درگیر بیماری VHS شدند و این شیوع وسیع، تلفات شدیدی را به همراه داشته است(۱۸). در این میان استان چهارمحال و بختیاری به‌عنوان بزرگ‌ترین تولیدکنندهٔ ماهی سردابی کشور از این رخداد مصون نماندند و متأسفانه بخش اعظمی از ماهیان مزارع آن تلف شدند. از نتایج مطالعهٔ حاضر مشخص شد مشابهت بالایی بین ژن گلیکوپروتئینی ویروس VHS ایران با سویه‌های اروپایی به‌ویژه آلمانی و فرانسوی وجود دارد که این اتفاق احتمال بروز این فرضیه که

ویروس VHS شایع‌شده در ماهیان ایران از طریق تخم‌های چشم‌زدهٔ وارداتی منتشر شده باشد را افزایش می‌دهد. مزارع تکثیر استان چهارمحال و بختیاری از جمله واردکنندگان عمدهٔ تخم چشم‌زدهٔ فرانسوی به شمار می‌روند و براساس اطلاعات به‌دست‌آمده از آن‌ها عموماً تمایل به نگهداری و پرورش این نوع بچه‌ماهی دارند از طرفی بچه ماهیان تولیدشده از این تخم‌ها پس از رسیدن به اندازهٔ انگشت قدی به مزارع دیگر در همان استان یا استان‌های دیگر منتقل می‌شوند که احتمال اشاعهٔ ویروس‌های احتمالی را افزایش می‌دهد؛ لذا مراجعی که در صدور مجوز واردات تخم خارجی به کشور نقش مؤثری داشته‌اند باید در شیوهٔ واردات و همچنین فرایند قرنطینهٔ محموله‌های بیولوژیکی تجدیدنظر کنند و اصول امنیت زیستی در مزراع پرورشی کشور قوانین را به‌طور جدی‌تری رعایت کنند. از این رو، ضروری است مزارع پرورشی نیز با اجرای اصول و قواعد مدیریت بهداشتی و تقدم فرآیند پیشگیری بر درمان به کاهش خطر بروز بیماری‌های عفونی از جمله ویروسی کمک کنند. این مطالعه نشان داد که محتمل‌ترین منشأ ویروس VHS در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان کشورمان تخم‌های خارجی وارد شده بود و ازآنجایی‌که مولدهای آلوده قادر به انتقال ویروس به تخم هستند لذا مسئولان مربوط در زمینهٔ نحوهٔ ورود این گونه محصولات زنده، باید دقت نظر بیشتری به عمل آورند و دیگر اینکه تکثیر بچه‌ماهی از مولدهای بومی را تقویت کنند. همچنین پیشنهاد می‌شود برای کلیهٔ مزارع پرورشی شیوه‌نامهٔ رعایت اصول بهداشتی تدوین شود و نظارت بخش‌های دولتی و خصوصی دراین‌باره تقویت شود.

References

(1) Basurco B, Vende P, Monnier AF, Winton JR, de Kinkelin P, Benmansour A. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV).*Veterinary research*.1995; 26(5-6): 460-3.

(2) Brudeseth BE, Evensen O. Occurrence of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Diseases of aquatic organisms*, 2002 ; 52(1): 21-28.

(3) StoneDM, Way K , Dixon PF. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.), *Journal of Virology*.1997; 78(6): 1319–1326.

(4) Meyers TR, Sullivan J, Emmeneger E, Follet J, Short S, Batts WN. Identification of viral haemorrhagic septicemia virus isolated from pacific cod, *Gadus macocephalus* in prince William Sound, Alaska, USA. *Diseases of aquatic organisms*,1992; 12: 167-75.

(5) Lorenzen N, Olesen NJ, Vestergård Jørgensen PE. Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Diseases of aquatic organisms*, 1988; 4: 35–42.

(6) Ammayappan A ,Vakharia VN. Molecular characterization of the Great Lakes viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolate from USA. *Virology Journal*, 2009; 6: 171.

(7) Hope KM, Casey RN, Groocock GH, Getchell RG, Bowser PR, Casey JW. Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. *Journal of aquatic animal health*. 2010; 22(1): 50-61.

(8) Sandlund N, Gjerset B, Bergh Ø, Modahl I, Olesen NJ. Johansen R. Screening for Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish along the Norwegian Coastal Line. *Plos One* ,e108529. 2014; 9(9): 1-12.

(9) Thiry M, Lecoq-Xhonneux F, Dheur I, Renard A, DeKinkelin P. Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica et biophysicaacta*, 1991; 1090(3): 345-347.

(10) Stone DM, Way K, Dixon PF. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS)viruses from different geographical areas: a link betweenVHS in farmed fish species and viruses isolated from north Sea cod (*Gadus morhua* L.). *The Journal of general virology*,1997; 7(6): 1319-1326.

(11) Jensen MH. Research on the virus of Egtved disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*,1965; 126(1): 422–426.

(12) Schlotfeldt HJ, Ahne W, Vestergard-Jorgensen PE, Glende W.Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-a natural outbreak. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 1991;11(3):105-7.

(13) Lorenzen N, Olesen NJ, Koch C. Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture*,1999; 172(1-2): 41–61.

(14) Pierce LR, Stepien CA. Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: Diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSv). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2012; 63(2): 327-341.

(15) Einer-Jensen K, Ahrens, Forsberg R, Lorenzen N. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *The Journal of general virology*. 2004; 85(5): 1167–1179.

(16) Skall HF, Slierendrecht WJ, King JA, Olsen NJ. Experimental infection of rainbow trout Oncorhynchus mykiss withviral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marineand farmed fishes. *Diseases of aquatic organisms*. 2004; 58(2-3): 99-110.

(17) Thiéry R ,De Boisséson C, Jeffroy J, Castric J, De Kinkelin P, Benmansour A. Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France(1971–1999). *Diseases of aquatic organisms*, 2002; 52(1): 29–37.

(18) Islamic Republic News Agency(2014) viral haemorrhagic septicaemia has been controlled in the rainbow trout, news cod: 4168132(81267720).

---

[1]- Office International des Épizooties
[2]- *Rhabdoviridae*
[3]- *Novirhabdovirus*
[4]- Neutralising surface antigen
[5]- Serum neutralization test
[6]- Quantitative RT-PCR
[7]- Infectious hematopoietic necrosis
[8]- *Clupea harengus*
[9]- *Melanogrammus aeglefinus*
[10]- *Merlangius merlangus*
[11]- *Gadiculus argenteus*
[12]- Trout plague
[13]- Egtved disease
[14]- Snakehead rhabdovirus
[15]- Maximum Likelihood
[16]- Bayesian approaches
[17]- Estimated nucleotide substitution rate
[18]- Infectious pancreatic necrosis

Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from rainbow trout in Chaharmahal and Bakhtiary province

Hosein Momeni
Member of Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran, momeni_hossein_dvm@yahoo.com
Firooz Fadaeifard *
Associate Professor of aquatic animal health and disease, Faculty of veterinary medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, fadaeifard@gmail.com
Hasan Momtaz
Professor of microbiology, Faculty of veterinary medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, hamomtaz@yahoo.com
Manoochehr Momeni
Member of Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran, momeniman@yahoo.com

Abstract

Introduction: Viral hemorrhagic septicemia (VHS) is known as the most serious disease of rainbow trout in aquaculture industry. In this study, VHS virus glycoprotein genes were identified in farmed rainbow trout by RT-PCR test. Then nucleotide sequencing and phylogenetic analysis were performed on the viral isolates.

Materials and methods: Suspected samples of VHS disease that collected from rainbow trout farms of Chaharmahal and Bakhtiari province were tested by RT-PCR method. Finally, the eight samples were identified as positive VHS strains and nucleotide sequencing was accomplished. Based on phylogenetic analysis, results of nucleotide sequences of glycoprotein gene were compared with other countries.

Results: The results of present study showed that genetic variation in the glycoprotein gene was 0-7.4 percent. There was the highest similarity of glycoprotein gene of Iranian strains up to 100% with Germany strain (EU708818) and the lowest similarity was showed in Japan (AB672616) and Turkey (JF415091) strains with 60/92 percent in each.

Discussion and conclusion: According to the genetic similarity of the VHS virus isolated from Iran with European strains, especially Germany and France, there is possibility of the relationship between the outbreak of VHS and eyed eggs imported from the mentioned countries.

Key words: Glycoprotein gene (G), Viral hemorrhagic septicemia virus, Phylogenetic analysis, RT-PCR

* Corresponding author
Received: May 17, 2015 / **Accepted:** September 12, 2015