

بررسی ژنوتیپ و مشخصه‌های ملکولی سویه‌های ویروس نکروز عفونی پانکراس شناسایی شده در برخی مزارع قزل‌آلای کشور

سهراب احمدی وند^{۱*}، مهدی سلطانی^۱

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۸ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۰۳ شهریور ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۲۶ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

بیماری نکروز عفونی پانکراس ناشی از ویروس IPNV است که سویه‌های مختلف آن دارای حدت متفاوتی مرتبط با برخی موتیف‌های کپسید VP2 می‌باشند. در مطالعه حاضر نمونه‌های مشکوک به بیماری IPN از مزارع قزل‌آلا در سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۱۹ بررسی و نمونه‌های مثبت تعیین ژنوتیپ شده و از نظر حدت مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویروس در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان با استفاده از واکنش RT-PCR ردیابی گردید. براساس آنالیز توالی آنتی‌ژن VP2، سویه‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp بوده و با همدیگر و با سایر سویه‌های ایرانی و همچنین سویه‌های گزارش شده در ترکیه و برخی کشورهای اروپایی بیش از ۹۹ درصد شباهت دارند. همچنین سویه‌های ایرانی شناسایی شده در این مطالعه دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم دیده می‌شوند. به طور خلاصه می‌توان عنوان نمود که سویه‌های شناسایی شده در برخی مزارع قزل‌آلای کشور (استان‌های همدان و کرمانشاه) متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند که علیرغم داشتن موتیف P₂₁₇T₂₂₁ دارای حدت متوسط می‌باشند و احتمالاً از طریق واردات تخم چشم زده به کشور وارد شده‌اند.

واژگان کلیدی: *IPN*/ایران، فیلوژنی، قزل‌آلا، *VP2*

مقدمه

نکروز عفونی پانکراس ویروس (IPN) یک بیماری ویروسی واگیردار و از عوامل اصلی تلفات در آبزیان به ویژه آزادماهیان است که عامل آن (IPNV) متعلق به جنس آکوا بیرونا ویروس و خانواده بیروناوریده می باشد (۱).

ویروس IPNV دارای ژنوم دو قطعه‌ای (A, B) و RNA دو رشته ای است که بدون پوشش غشایی بوده و دارای تقارن بیست وجهی و یک کپسید متشکل از ۹۲ کپسومر و با ضخامت حدود ۶۰ نانومتر می باشد (۲). قطعه ژنومی B با اندازه کوچکتر، پروتئین غیر ساختاری VP1 را کد می کند. قطعه A با اندازه بزرگتر از نظر ساختاری و عملکردی، تک پیامه و شامل یک قالب باز خواندنی (ORF) بزرگ و یک قالب بازخواندنی کوچک است. قالب بازخواندنی بزرگ، پلی پروتئین پیش ساز -VP3-VP4-VP2-pre (NH2-COOH) و قالب بازخواندنی کوچک، پروتئین غیر ساختاری غنی از آرژینین به نام VP5 را کد می کند (۱، ۲).

بیماری IPN معمولاً در دمای ۱۰-۱۵ درجه سانتی گراد بروز می نماید و با علائم عمومی شامل شنای چرخشی، تیرگی پوست، اگزوفتالمی، آسیت شکمی و کم رنگ شدن آبشش‌ها همراه است. تلفات بیماری با توجه به سویه ویروس، گونه و سن ماهی و همچنین شرایط محیطی می تواند از ۵ تا ۹۰ درصد متفاوت باشد (۳، ۴).

این ویروس باعث تلفات بالا به ویژه در بچه ماهیان نارس تازه به تغذیه افتاده و بچه ماهیان انگشت قد، ماهیان وحشی و پرورشی به ویژه ماهی آزاد اطلس و قزل آلا می گردد (۱، ۴). بعلاوه باعث ایجاد حاملین بدون علامت در ماهیان بازمانده می گردد که در تمام طول زندگی حامل این ویروس بوده که علاوه بر انتقال عمودی با دفع ویروس به محیط موجب انتقال افقی و متعاقباً ماندگاری و انتشار بیشتر ویروس در جمعیت ماهیان می شوند (۵).

دو گروه سرمی (A و B) مجزای بیرونا ویروس های آبی شامل ۱۰ سروتیپ وجود دارد (سروتیپ های B1 و A1-A9) که همه به جز *Tellina virus-1* متعلق به گروه سرمی B، برای ماهی ها بیماری زا هستند (۶).

همچنین سویه های مختلف IPNV براساس توالی آنتی ژن VP2 به ۷ گروه ژنومی تقسیم بندی می شوند که با منشأ جغرافیایی و گروه سرمی تطابق دارند (۷، ۸). آنتی ژن VP2 مسئول تولید آنتی بادی های مونوکلونال اختصاصی تیپ می باشد و تغییرات در بقایای برخی اسید آمینه های آن به ویژه ۲۱۷، ۲۲۱ و ۲۴۷ روی حدت سویه های IPNV تاثیر می گذارد (۹، ۱۰).

بیش از یک دهه است که IPN در ایران با سرعت پیشرونده ای به صورت یک بیماری همه گیر درآمده و باعث ضرر و زیان های اقتصادی به صنعت در حال رشد قزل آلا ی کشور گردیده است. بر اساس مطالعه فیلوژنی انجام شده توسط سلطانی و همکاران در طی سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳ تمامی ژنوتیپ های IPNV در مزارع کشور شایع بوده اند (۱۱)، اگرچه حدت سویه ها در مطالعه مذکور ارزیابی نشده است. آنالیز توالی ژن های مختلف یک سویه ایرانی در ۲۰۱۲ مشخص نمود که ویروس متعلق به ژنوتیپ ۵ با منشأ اروپایی می باشد و علیرغم اینکه از مزرعه ای با تلفات متوسط جداسازی شده بود دارای موتیف P217T221A247 بود که معمولاً در سویه های غیر بیماری زا مشاهده شده است (۱۲).

اگرچه IPNV همچنان در مزارع کشور شایع است، اما از سال ۲۰۱۳ مطالعه ای دیگری در خصوص ژنوتیپ و مشخصه های ملکولی سویه های موجود در کشور صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر نمونه های مشکوک به IPN به دست آمده از برخی مزارع قزل آلا ی کشور در طی سال های ۲۰۱۸ و ۲۰۱۹ تعیین ژنوتیپ شده و از نظر حدت مورد بررسی قرار گرفته اند.

مواد و روش ها

نمونه ها و بررسی آزمایشگاهی: نمونه های ماهی براساس گزارش انجام شده از تلفات مشکوک به بیماری IPN از مزارع پرورشی قزل آلا ی رنگین کمان استان های کرمانشاه (شهرستان پاره)، همدان (شهرستان نهاوند) و مازندران (آمل) جمع آوری شدند. وزن ماهیان کمتر از ۱۰

دقیقه، ۴۰ سیکل (۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه) و ۱ سیکل ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان نیز محصول واکنش‌ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل ۱ درصد اگارز بررسی و باندها با استفاده از کیت اختصاصی شرکت Viogen خالص‌سازی و به‌صورت تجاری توالی‌یابی گردید. تشخیص افتراقی نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی IHNV و VHSV بر اساس مطالعات قبلی Ahmadivand و همکاران صورت گرفت (۱۴، ۱۵).

مطالعه فیلوژنی نمونه‌های ویروسی: نمونه‌ها پس از خوانش توالی با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime (<http://www.geneious.com/>) و BioEdit آنالیز شده و در نهایت پس از بلاست نمودن و تایید در NCBI در بانک ژن ثبت و از نظر فیلوژنی (روش Neighbor-joining مدل HKY و بوت استرپ ۱۰۰۰) نیز با سایر سویه‌ها مقایسه شدند و درخت فیلوژنی رسم گردید.

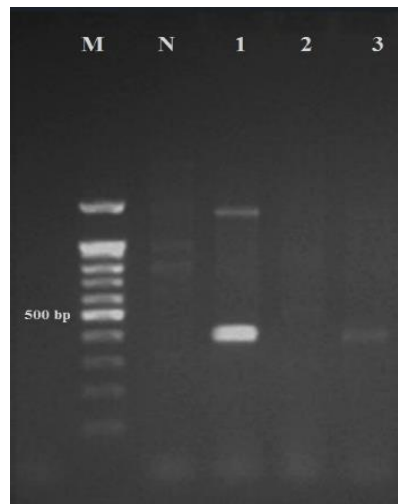
نتایج

تشخیص مولکولی: بر اساس نتایج آزمایش RT-PCR وجود ویروس IPNV با مشاهده باند ۴۰۵ bp آنتی ژن VP2 در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان تایید شد (شکل ۱). در نمونه مشکوک استان مازندران ژنوم ویروس IPNV مشاهده نگردید و بر اساس آزمایش تشخیص تفریقی تلفات ناشی از ویروس IHNV بود. کشت باکتریایی نمونه‌های IPNV مثبت هیچ گونه پاتوژنی را نشان نداد و همچنین هیچ گونه آلودگی انگلی در ماهیان مبتلا به IPN مشاهده نشد.

گرم و میانگین دمای آب مزارع نیز بین ۹ تا ۱۳ درجه سانتی‌گراد بود. میزان تلفات حدود ۴۰-۶۰ درصد گزارش شده و در ماهیان مشکوک علائمی نظیر تیرگی پوست، بیرون‌زدگی چشم و کم‌رنگی آبشش‌ها و جود مایع زرد رنگ داخل روده مشاهده گردید. برای بررسی آلودگی انگلی از پوست و آبشش ماهیان لام مرطوب تهیه شد. همچنین از بافت کلیه ماهیان کشت باکتریایی بر روی محیط ژلوز خون‌دار در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. به منظور تشخیص مولکولی عفونت‌های ویروسی بافت کلیه و طحال ماهیان نمونه‌برداری و در اتانول ۷۰ درصد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (RT-PCR): استخراج

RNA ویروس با استفاده از کیت (ExgeneTM Viral DNA/RNA kit (GeneAll, Korea) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از نانو دراپ و قرار دادن در ژل الکتروفورز بررسی شد. سپس با استفاده از کیت HyperScriptTM First strand Synthesis Kit (GeneAll, Korea) بر طبق پروتوکول شرکت سازنده cDNA تهیه گردید. در نهایت واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP2: SVP2-F: (۱۳)،
 VP2: 5' GTTCGACAAGCCATACGTCC 3' و SVP2-R: 5' GCTTGGTGATGTTCTCGGTC 3' در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase Mix Red (GeneAll, Korea) و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه واکنش شامل ۱ سیکل ۹۴°C به مدت ۱۰

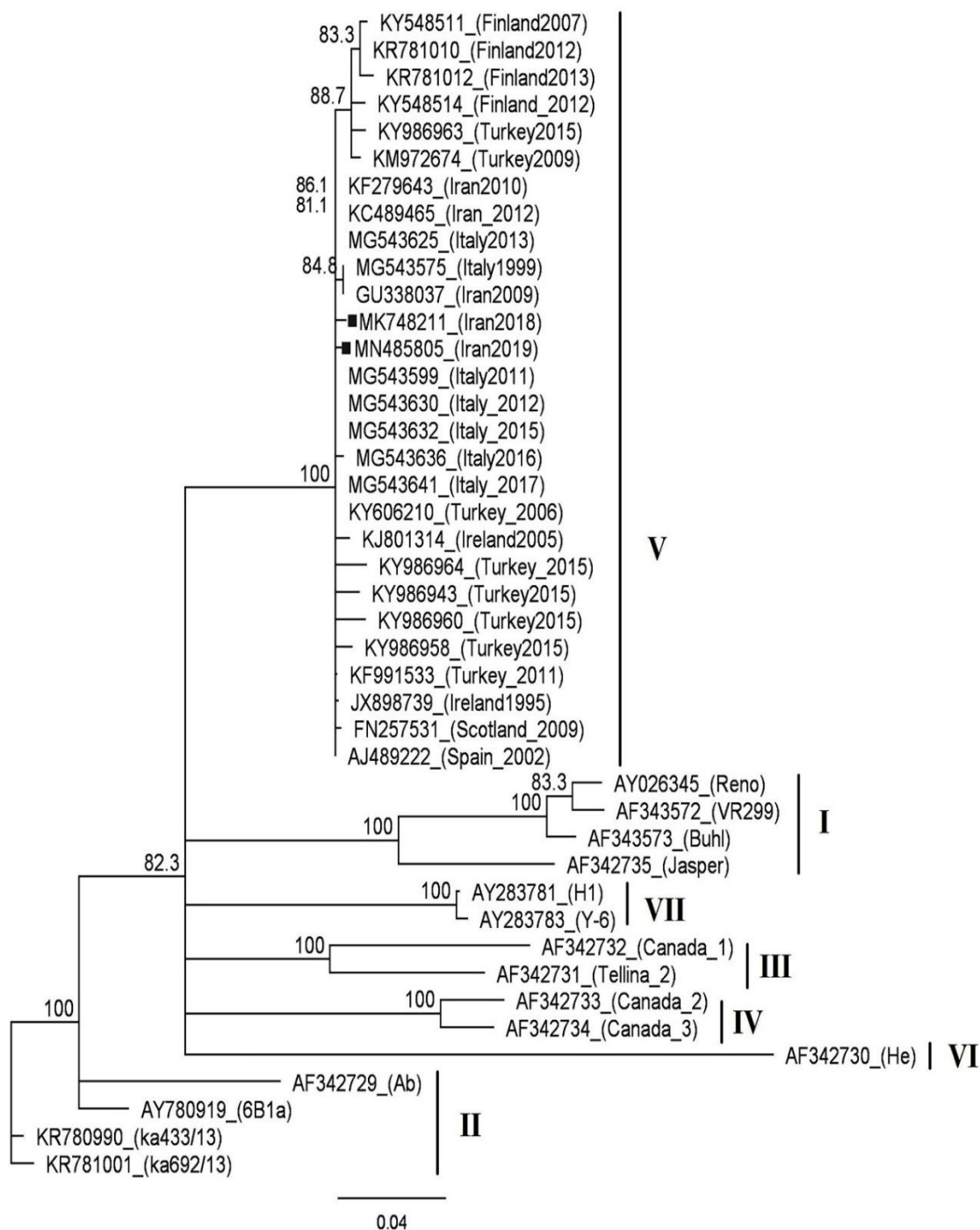


شکل ۱- انجام واکنش RT-PCR برای تشخیص ویروس عامل بیماری IPN با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن VP2 (۴۰۵ bp) در نمونه‌های بافت کلیه ماهیان مشکوک به بیماری. M: مارکر ۱۰۰ bp، N: کنترل منفی، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب نمونه‌های مزارع استان‌های همدان، مازندران و کرمانشاه می‌باشند. محصول واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیز شده است.

از ۹۹ درصد شباهت نشان دادند (شکل ۳).
سویه‌های ایرانی شناسایی شده دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم یا تحت بالینی دیده می‌شوند. همچنین اسیدهای آمینه موجود در موقعیت ۲۴۷ پروتئین VP2 که معمولاً بسیار متغیر است و ممکن است با حدت ویروس در ارتباط باشد در سویه‌های شناسایی شده در کرمانشاه و همدان به ترتیب اسید گلوتامیک و آلانین بودند (موتیف‌های P₂₁₇T₂₂₁E₂₄₇ و P₂₁₇T₂₂₁A₂₄₇).
به‌علاوه سویه‌های SP10 و S.AV-IR.IPNV5 به ترتیب دارای موتیف‌های I₁₉₉D₂₅₂D₂₅₇T₂₈₁N₂₈₂G₂₈₆V₂₈₈ و I₁₉₉N₂₅₂H₂₅₇T₂₈₁N₂₈₂R₂₈₆V₂₈₈ بودند که پیشنهاد شده با حدت مرتبط هستند (۱۶)، (جدول ۱).

آنالیز توالی: نمونه‌های مثبت IPNV با استفاده از توالی‌یابی قطعه ژنوم تکثیر شده تأیید شدند. توالی آنتی‌ژن VP2 دو سویه IPNV شناسایی شده از مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان در بانک جهانی NCBI به ترتیب با کدهای دسترسی MK748211 و MN485805 ثبت شده‌اند.

براساس آنالیز فیلوژنی آنتی‌ژن VP2، سویه‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند (شکل ۲). مقایسه توالی آنتی‌ژن سویه‌های ویروس با همدیگر و با سایر سویه‌های جداسازی شده از دیگر استان‌های کشور در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۲ (GU338037، KF279643 و KC489465) و همچنین سویه‌های شناسایی شده در ترکیه و برخی کشورهای اروپایی از جمله اسپانیا، ایتالیا، اسکاتلند، فلاند و ایرلند بیش



شکل ۲- آنالیز فیلوژنی سویه‌های ایرانی ویروس عامل نکروز عفونی بانکراس (IPNV) بر اساس توالی آنتی‌ژن VP2 (۴۰۵ bp). هم‌ردیف‌سازی و آنالیز فیلوژنی با استفاده نرم‌افزار Geneious Prime با روش Neighbor-joining (مدل HKY) و بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شده است. نمونه‌های ویروس یافت شده در این مطالعه با مربع سیاه رنگ مشخص شده‌اند.

MK748211 (Iran-2018)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
MN485805 (Iran-2019)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
KF279643 (Iran-2010)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
KC489465 (Iran-2012)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
GU338037 (Iran-2009)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
KF991533 (Turkey-2011)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
AJ489222 (Spain-2002)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
MG543632 (Italy-2015)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
FN257531 (Scotland-200)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
KJ801314 (Ireland-2005)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
KR781010 (Finland-2012)	1	GGTTCGACAAACCCATACGTCGCCCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGGCCAAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACG
MK748211 (Iran-2018)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
MN485805 (Iran-2019)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
KF279643 (Iran-2010)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
KC489465 (Iran-2012)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
GU338037 (Iran-2009)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
KF991533 (Turkey-2011)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
AJ489222 (Spain-2002)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
MG543632 (Italy-2015)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
FN257531 (Scotland-200)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
KJ801314 (Ireland-2005)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
KR781010 (Finland-2012)	101	GAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCCCGTTCCTGCGACAGGAAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGGGAAACGCCGACATCGTCAACTCC
MK748211 (Iran-2018)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
MN485805 (Iran-2019)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
KF279643 (Iran-2010)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
KC489465 (Iran-2012)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
GU338037 (Iran-2009)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
KF991533 (Turkey-2011)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
AJ489222 (Spain-2002)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
MG543632 (Italy-2015)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
FN257531 (Scotland-200)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
KJ801314 (Ireland-2005)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
KR781010 (Finland-2012)	201	ACAACAGTGACGGGAGACATAAACTTCAGTCTGGCAACAACCCCGGAAACGAGACCAAGTTCACCTCCAGCTGGACTTCATGGGCTTGACAATGACG
MK748211 (Iran-2018)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
MN485805 (Iran-2019)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
KF279643 (Iran-2010)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
KC489465 (Iran-2012)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
GU338037 (Iran-2009)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
KF991533 (Turkey-2011)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
AJ489222 (Spain-2002)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
MG543632 (Italy-2015)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
FN257531 (Scotland-200)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
KJ801314 (Ireland-2005)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC
KR781010 (Finland-2012)	301	TCCAGTGGTTCACAGTGGTTCAGCTCCGCTGCTGGCCACAAACGCAACACTACAGAGGAGTCTCAGCCAAAGATGACCCAGTCCATCCCGACCGGAAACATCAC

شکل ۳- هم‌ردیف‌سازی قسمتی (405 bp) از توالی آنتی ژن (VP2) سویه‌های ویروس IPNV شناسایی شده در این مطالعه (MK748211) و MN485805 با سایر سویه‌های ایران در طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۲ (KF279643, GU338037, KC489465) و کشورهای اسپانیا (AJ489222)، ترکیه (KF991533)، ایتالیا (MG543632)، اسکاتلند (FN257531)، ایرلند (KJ801314) و فنلاند (KR781010) که همگی متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ A2 (Sp) می‌باشند.

جدول ۱- مقایسه اسیدهای آمینه آنتی ژن VP2 مرتبط با حدت سویه‌های ویروس IPNV شناسایی شده در مزارع قزل‌آلا

کد دسترسی	ژنوتیپ (سروتیپ)	جدایه	موقعیت اسید آمینه									
			۱۹۹	۲۱۷	۲۲۱	۲۴۷	۲۵۲	۲۵۷	۲۸۱	۲۸۲	۲۸۶	۲۸۸
MN485805	5 (Sp)	SP10	I	P	T	A	D	D	T	N	G	V
MK748211	5 (Sp)	S.AV-IR.IPNV5	I	P	T	E	N	H	T	N	R	V
KC489465	5 (Sp)	^(۱) IRIPNV	I	P	T	A	D	H	T	N	G	V
AJ489222	5 (Sp)	^(۲) Sp (I164)	I	P	T	A	N	H	T	N	R	V

تشخیص و شناسایی سریع عوامل بیماری‌زای
 بحث و نتیجه‌گیری
 اختصاصی مانند IPNV در نظارت فعال بهداشتی و

دارد که منشأ آلودگی ویروس‌های ایرانی از مسیر واردات تخم‌های چشم زده آلوده از اروپا بوده باشد که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق ترکیه صورت گرفته باشد. بعلاوه میزان شباهت سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه با همدیگر و سایر سویه‌های ایرانی می‌تواند ناشی از معرفی ویروس از یک منبع محدود و جابجایی بیش از حد آن بین مزارع کشور باشد.

پروتئین VP2 کپسید خارجی ویروس را تشکیل می‌دهد که حاوی همه اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده، محل‌های اتصال به سلول میزبان و رده‌های سلولی رشدیافته در آن است (۱، ۲). VP2 حامل فاکتورهای تعیین‌کننده‌ای برای حدت IPNV است به‌طوری که تغییر اسیدآمینه‌های آن می‌تواند ویژگی‌های این پروتئین به ویژه خاصیت آنتی‌ژنتیکی و میزان مرگ و میر ایجاد شده به وسیله ویروس در ماهیان را تحت تأثیر قرار دهند (۹، ۱۰).

بر اساس مطالعات آزمایشگاهی ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، در گونه‌های حد، ترئونین و آلانین به ترتیب در موقعیت‌های ۲۱۷ و ۲۲۱ از پروتئین VP2 وجود دارند، در حالی که سویه‌های با حدت متوسط تا خفیف دارای پرولین و آلانین در این موقعیت هستند. سویه‌های با اسید آمینه ترئونین در موقعیت ۲۲۱ معمولاً سویه‌های غیرحد هستند (۹، ۱۰). اسیدهای آمینه موجود در موقعیت ۲۴۷ پروتئین VP2 بسیار متغیر است و ممکن است با حدت ویروس در ارتباط باشد. Santi و همکاران (۹) نشان دادند که موتیف‌های T₂₁₇A₂₂₁T₂₄₇ در ارتباط با حدت بالای ویروس هستند و موتیف‌های P₂₁₇A₂₂₁A₂₄₇ در سویه‌های با حدت کم تا متوسط دیده می‌شوند. اگرچه میزان حدت IPNV را با برخی موتیف‌های دیگر در موقعیت‌های ۱۹۹، ۲۵۰، ۲۵۲، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۶، ۲۸۸، ۳۲۱ و ۵۰۰ نیز مرتبط دانسته است (۱۶، ۲۰، ۲۱). با این وجود گزارشات متناقضی در خصوص ارتباط این موتیف‌ها با حدت IPNV در سایر گونه‌های وحشی و پرورشی به ویژه در قزل‌آلا و در شرایط فیلد ارائه شده است (۱۲، ۲۴-۲۲).

Bain و همکاران گزارش کرده‌اند که سویه‌های با

جلوگیری از گسترش عفونت به‌ویژه در حاملین بدون علامت سودمند است. در حال حاضر، تشخیص IPNV بر ایجاد اثرات سیتوپاتیک مشخص در کشت‌های سلولی و سپس تأیید به وسیله انواع مختلفی از روش‌های سرم‌شناسی و مولکولی استوار است (۱۶). اگرچه حاملین بدون نشانه ممکن است مانع تشخیص و جداسازی موفقیت آمیز IPNV شوند (۱۷، ۱۸).

تشخیص اسیدهای نوکلئیک ویروسی به وسیله روش‌هایی بر پایه PCR عموماً به‌عنوان روش‌های دارای اختصاصیت بالا ارزیابی شده‌اند. یکی از روش‌های تشخیص IPNV آزمایش RT-PCR با استفاده نمونه‌های بافتی کلیه است که ژنوم ویروس را در موارد بالینی و تحت بالینی به آسانی ردیابی می‌نماید و می‌تواند جایگزین مناسبی برای کشت سلولی شود (۱۸-۱۶).

در این مطالعه نیز وجود ویروس IPNV با استفاده از واکنش RT-PCR و تکثیر آنتی‌ژن VP2 در نمونه‌های مزارع استان‌های کرمانشاه و همدان تایید شد.

علاوه بر تشخیص، توالی آنتی ژن VP2 برای مطالعات فیلوژنی و همچنین تعیین حدت سویه‌های ویروس IPNV مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹).

بر اساس مقایسه توالی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای آنتی‌ژن VP2 تعدادی از بیروناویروس‌های آبی، شش ژنوگروپ (I-VI) مجزا گزارش شده که با سروتیپ‌های شناخته شده قبلی همبستگی و هم‌خوانی دارد (۷). همچنین ژنوگروپ دیگری (VII) نیز بر اساس تجزیه ناحیه اتصال VP2/NS قطعه ژنومی A ویروس پیشنهاد شده است (۸).

براساس آنالیز فیلوژنی آنتی‌ژن VP2، مشخص شد که سویه‌های شناسایی شده در مزارع همدان و کرمانشاه متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند و شباهت زیادی (>۹۹٪) با همدیگر و با سویه‌هایی از کشورهای اروپایی، ترکیه و موارد قبلی گزارش شده از ایران دارند.

بنابراین با توجه به واردات بی‌رویه این احتمال وجود

درصد) در خصوص حساسیت نژادهای مختلف گونه قزل‌آلای رنگین کمان به ویروس IPNV را گزارش نموده‌اند (۲۵). بنابراین تفاوت‌های نژادی - گونه‌ای میزان و سایر خصوصیت‌های ژنتیکی ویروس می‌توانند تبیین‌کننده این نتایج باشند.

به طور خلاصه می‌توان عنوان نمود که سویه‌های شناسایی شده در مزارع قزل‌آلای کشور (استان همدان و کرمانشاه) متعلق به ژنوتیپ ۵ و سروتیپ Sp (A2) با منشأ اروپایی می‌باشند، که علیرغم داشتن موتیف P217T221 دارای حدت متوسط می‌باشند و احتمالاً از طریق واردات تخم چشم زده به کشور وارد شده‌اند. بنابراین اقدامات پیشگیرانه و نظارت بهداشتی بیشتر برای کنترل بیماری IPNV در کشور پیشنهاد می‌گردد.

References

- 1- Evensen Ø, Santi N. Infectious pancreatic necrosis virus, In: Mahy BWJ, Van Regenmortel, M.H.V (Ed.) Encyclopedia of virology (3rd edn). Academic Press, Oxford. 2008, p:83-89.
- 2- Dobos P. Size and Structure of Genome of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. Nucleic Acids Res. 1976; 3: 1903-1924.
- 3- Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1988, p: 476.
- 4- Reno P. W. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In P. T. K. Woo, & D. W. Bruno (Eds.), Fish Diseases and Disorders. New York: CABI publishing. 1999, p: 1-55.
- 5- Rodriguez Saint-Jean S, Vilas Minondo M.P, Palacios A, Perez-Prieto S. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Richardson), by flow cytometry. J. Fish Dis. 1991; 14: 545-553.
- 6- Hill B.J, Way K. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. Ann Rev Fish Dis. 1995; 5: 55-77.
- 7- Blake S, Ma J.Y, Caporale D.A, Jairath S, Nicholson BL. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. Dis Aquat Org. 2001; 45: 89-102.

پرولین و آلانین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ به ترتیب دارای حدت‌های بالایی در شرایط فیلد و در شرایط آزمایشگاهی هستند (۲۲).

سویه‌های ایرانی شناسایی شده در این مطالعه دارای اسیدهای آمینه پرولین و ترئونین در موقعیت ۲۱۷ و ۲۲۱ بودند که معمولاً در سویه‌های با حدت کم یا تحت بالینی دیده می‌شوند. علیرغم حضور ترئونین در موقعیت ۲۲۱ که نشانگر غیرحاد بودن سویه‌ها است تلفات مشاهده شده در قزل‌آلای نشانگر وجود سویه با حدت متوسط است. نتایج مشابهی توسط Dadar و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شده است (۱۲). حدت خفیف تا متوسط سویه‌های ایرانی ممکن است در ارتباط با اسید آمینه آلانین موجود در دیگر موقعیت‌ها به ویژه ۲۴۷ باشد.

به‌علاوه مطالعات اخیر تفاوت بسیار زیادی (۱۰۰-۰)

- 8- Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. J Gen Virol. 2005; 86: 1973-1978.
- 9- Santi N, Vakharia V.N, Evensen Ø. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology. 2004; 322: 31-40.
- 10- Shivappa R, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen Ø, Vakharia V.N. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting divergences in virulence. Dis. Aquat. Org. 2004; 61: 23-32.
- 11- Soltani M, Rouholahi S, Ebrahimzadeh Mousavi H.A, Abdi K, Zargar A, Mohamadian S. Genetic diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran. Bulletin European Association of Fish Pathologists. 2014; 34: 155-164.
- 12- Dadar M, Peyghan R, Memari H. R, Shapouri M.R.S.A, Hasanzadeh R, Goudarzi L.M. Vakharia, V.N.. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012. Virus Genes. 2013; 47: 574-578.
- 13- Ahmadvand S, Soltani M, Behdani M, Evensen Ø, Alirahimi E, Hasanzadeh R, Soltani

E.. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. *Dev. Comp. Immunol.* 2017; 74: 178-189.

14- **Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpour S, Hassanzadeh R, Rahmati-Holasoo H, Ahmadpoor M.** Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis. *Virus Res.* 2017; 229: 17-23.

15- **Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpour S, Rahmati-Holasoo H, Mokhtari A, Hasanzadeh R.** Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Trop.* 2016; 156: 30-36.

16- **Dopazo C.P.** The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. *Pathogens.* 2020; 9: 94.

17- **OIE.** Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 5th edition. Health World Organization for Animal, Paris. 2006.

18- **Taksdal T, Dannevig B.H, Rimstad E.** Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 2001; 21: 214-219.

19- **Ørpetveit I, Mikalsen A.B, Sindre H, Evensen O, Dannevig B.H, Midtlyng P.J.** Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription pol-

ymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22: 886-895.

20- **Smail D. A, Bain N, Bruno D. W, King J. A Thompson F, Pendrey D. J, Cunningham C. O.** Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J. Fish Dis.* 2006; 29: 31-41.

21- **Mutoloki S, Jøssund T.B, Ritchie G, Munang'andu E.M Evensen, Ø.** Infectious Pancreatic Necrosis Virus Causing Clinical and Subclinical Infections in Atlantic Salmon Have Different Genetic Fingerprints. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 195-210.

22- **Bain N, Gregory A, Raynard R. S.** Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. *J Fish Dis.* 2008; 31: 37-47.

23- **Eriksson-Kallio A.M, Holopainen R, Viljamaa-Dirks S, Vennerström P, Kuukka-Anttila H, Koski, P, Gadd T.** Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strain with genetic properties associated with low pathogenicity at Finnish fish farms. *Dis Aquat Org.* 2016; 118: 21-30.

24- **Büyükekiz A.G, Altun S, Hansen E.F, Saticioglu I.B, Duman M, Markussen T, Rimstad E.** Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp is prevalent in Turkish rainbow trout farms. *J. Fish Dis.* 2017; 41: 95-104.

25- **Yoshida G. M, Carvalheiro R, Rodriguez F. H, Lhorente J. P, Yanez J. M.** Single-step genomic evaluation improves accuracy of breeding value predictions for resistance to infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. *Genomics.* 2019; 111: 127-132.

Genotyping and molecular characterization of the infectious pancreatic necrosis virus isolates detected in some Iranian trout farms

Sohrab Ahmadvand^{1*}, Mehdi Soltani¹

1 - Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: July 18, 2020; Revise: August 24, 2020; Accept: September 16, 2020

Summary

Infectious pancreatic necrosis is caused by IPNV virus that is represented by various strains with different virulence linked to some motifs of the VP2 capsid. In this study (2018-2019), we screened some suspected Iranian trout farms for IPNV, and the genotype and virulence motifs of the positive samples were characterized. The causative agents of two outbreaks in trout farms of Kermanshah and Hamedan Provinces in Iran were diagnosed as IPNV by RT-PCR assay. Phylogenetic analysis of VP2 gene revealed that the detected IPNV isolates belonged to the Genotype 5 (Sp serotype) with close identity (> 99%) with European, Turkish, as well as previously reported Iranian isolates. Characterization of VP2 from both outbreaks has also shown the detected isolates have proline and threonine at amino acid residues 217 and 221, respectively, which are associated with low pathogenicity. In conclusion, the IPNV isolates from some Iranian trout farms (Kermanshah and Hamedan Provinces) are of Sp serotype (Genotype 5) that despite P₂₁₇T₂₂₁ motif show moderate virulence, and may have originated from Europe via eyed eggs.

Keywords: IPN, VP2, trout, phylogeny, virulence