مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بررسی حساسیت بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به بیماری نکروز عصبی ویروسی Viral Nervous Necrosis Virus (VNN) و تاثیر آن بر فراسنجه‌های ایمنی شناسی و آسیب شناسی بچه ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جلبک *Chelorella vulgaris*

حسین عمادی[۱]، افرا صابری[۱]، سید محمد جلیل ذریه زهرا[۲*]، شاپور کاکولکی[۲]، سید محمدرضا فاطمی[۱]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

[۲] سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۱۰/۱۸
اصلاح: ۹۴/۱۲/۱۶
پذیرش: ۹۵/۰۱/۱۸

کلمات کلیدی:
آسیب شناسی
فراسنجه‌های ایمنی
ماهی آزاد
VNN
IFAT

چکیده

در این تحقیق، حساسیت بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) و نیز اثرات جلبک *کلرلا ولگاریس* (*Chelorella vulgaris*) بر فراسنجه های ایمنی آنها مورد بررسی قرار گرفت. بچه ماهیان در ۴ تیمار مختلف با ۳ تکرار تقسیم بندی شدند. به غذای تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳، مقادیر مختلفی از جلبک کلرلا (به ترتیب برابر با ۰، ۱×۱۰^{۸} Cell/ml، ۲×۱۰^{۷} و ۳×۱۰^{۶} به ازای هر ۴۵۰ گرم غذا) افزوده شد و آنها به مدت ۸ هفته غذا دهی شدند. در پایان هفته هشتم خونگیری شد و فراسنجه‌های ایمنی آنها (IgM، انفجار تنفسی، لیزوزیم، C_3، C_4، پروتئین تام و آلبومین) مورد سنجش قرار گرفت. سپس ماهیانی از همه تیمارها انتخاب و با سوپرناتانت تهیه شده از کفال ماهیان بیمار مواجه سازی و به مدت ۱۴ روز پایش شدند تا بیماریزایی ویروس و تغییرات فراسنجه‌های ایمنی بچه ماهیان در روند مواجه سازی مشخص شود. نتایج نشان داد که این بچه ماهیان نسبت به ویروس VNN مقاوم هستند و آثار مخرب ویروس در بافتهای هدف هیچ‌یک از تیمارها مشاهده نشد. در واقع این جلبک سبب تحریک سیستم ایمنی ماهیان شده که احتمالا به وجود ترکیباتی همچون رنگدانه کاروتنوئید و انواع ویتامین‌ها در آن ارتباط دارد.

مقدمــه

بیماری نکروز عصبی ویروسی (Viral Nervous Necrosis) یکی از مهمترین بیماری های ماهیان دریایی پرورشی و وحشی است که عمدتاً در بچه ماهیان و ماهیان جوان رخ داده و خسارات زیادی را در صنعت پرورش ماهیان دریایی ایجاد می کند. این بیماری در بسیاری از نقاط جهان گزارش شده و می تواند در مناطق دریایی گرمسیری و معتدل شیوع یابد. تا کنون ابتلای بیش از ۵۰ گونه از ماهیان دریایی پرورشی و وحشی به این بیماری گزارش شده است (OIE, 2010; Cherif *et al.*, 2008).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zorrieh@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

در ماهیان مبتلا به این بیماری، علائم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی همچون رفتارهای شنای غیرمعمول (مارپیچی، چرخشی یا خوابیده بر آب با شکمی متورم) مشخص می گردد. به طور معمول در ماهیان جوان ضایعات با شدت بیشتری به چشم می خورند. بافت های عصبی (سیستم اعصاب مرکزی) و بافت شبکیه چشم ماهیان به عنوان بافت های هدف در این بیماری مطرح می باشند. در ماهیان مسن تر ضایعات گسترده نیست و در این سنین ضایعات نسبت به شبکیه چشم تمایل بیشتری دارند (Adachi *et al.*, 2008). از دیگر علائم این بیماری، تغییر رنگ پوست و عدم تمایل به خوردن غذا است (Roongkamnertwongsa *et al.*, 2005). از جمله اقدامات پیشگیرانه علیه این بیماری می توان به استفاده از مولدین عاری از بیماری، کیفیت تغذیه مناسب، ارتقای شیوه های پرورش و نگهداری، ضد عفونی نمودن مناسب، استفاده از پروبیوتیک ها و محرک های ایمنی، رعایت اصول قرنطینه و انجام آزمایش های کنترلی بر ماهیان جدید وارد شده به مزرعه اشاره نمود (Samuelsen *et al.*, 2006).

این بیماری با توجه به انتشار گسترده در جهان و اثبات قابلیت ابتلای ماهی کفال دریای خزر (*Liza aurata*) و حضور بیش از یک دهه در دریای خزر، به عنوان یک تهدید جدی برای آبزیان و صنعت شیلات محسوب می گردد (Zorriehzahra *et al.*,2005) . یکی از گونه های با ارزش دریای خزر که می تواند مورد تهدید این بیماری قرار بگیرد، ماهی آزاد دریای خزر می باشد.

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1870) یکی از با ارزش ترین گونه های اقتصادی و بومی دریای خزر محسوب می شود (Emadi,1985). این ماهی طبق معیارهای IUCN در لیست قرمز و در زمره ماهیان در معرض خطر انقراض قرار دارد (Coad, 2000). متاسفانه با توجه به ابتلای کفال ماهیان دریای خزر به بیماری VNN نگرانی هایی در رابطه با امکان ابتلای ماهی آزاد دریای خزر به این بیماری نیز وجود دارد.

از طرفی، همچون سایر بیماری های ویروسی آبزیان، درمانی جدی و موثری برای بیماری VNN در آبزیان وجود ندارد اما اثرات مثبت جلبک هایی مانند کلرلا و اسپیرولینا بر بهبود آثار بیماری‌زایی این ویروس در ماهیانی همچون هامور (*Epinephelus marginatus*) امید بخش بوده است (Katharios *et al.*, 2005).

همچنین با توجه به اینکه امروزه بهره گیری از محرک های سیستم ایمنی در کنترل، پیشگیری و درمان بیماری های عفونی آبزیان به عنوان یک رویکرد جدید و موثر در آبزی پروری جهان مطرح می باشد، استفاده از ترکیبات طبیعی همچون جلبک ها و میکروجلبک ها نیز با توجه به سازگار بودن آن از نظر مسائل زیست محیطی از اقبال بیشتری در میان محققین و کاربران برخوردار است. از این رو در این تحقیق علاوه بر بررسی قابلیت بیماریزایی نمونه ویروسی (سوپرناتانت) جداسازی شده از ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) آلوده دریای خزر، به بحث در مورد اثرات جلبک *کلرلا ولگاریس* بر فراسنجه های ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر نیز پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی

تعداد ۱۵۰۰عدد بچه ماهی آزاد انگشت قد دریای خزر (با وزن اولیه ۱۰-۸ گرم) از مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، تهیه گردید و با استفاده از ماشین حمل ماهی مجهز به هواده به محل نگهداری ماهیان در پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر (ساری) انتقال یافت. ماهیان به مدت دو هفته جهت سازگاری نگهداری و طی این مدت با غذای پایه (بیومار، فرانسه) تغذیه شدند.

اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

طی مراحل این تحقیق به منظور کنترل کیفیت آب، فاکتورهای دما، اکسیژن و pH با استفاده از مولتی متر (HI 9828, Multiparameter Meter, HANNA Instruments, USA) به صورت روزانه اندازه گیری شد. میانگین مقادیر دما، اکسیژن و pH به ترتیب برابر با ۱۶درجه سانتی گراد، ۸ میلی گرم در لیتر و ۷/۵ بود.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

بررسی اولیه جهت اطمینان از عدم آلودگی ماهیان

در بدو ورود ماهیان، حدود ۵ درصد آنها یعنی ۴۵ عدد ماهی به صورت کاملا تصادفی نمونه برداری شدند و تخلیه مغز و چشم آنها (بافت های هدف این ویروس) صورت گرفت و به صورت گروه های ۵ تائی (Pool) در آمد. سپس آزمایش غربالگری اولیه با استفاده از کیت تشخیص سریع بیماری انجام شد تا از عدم وجود ویروس نکروز عصبی در بین ماهیان مورد استفاده در این تحقیق، اطمینان حاصل گردد.

تهیه جلبک *کلرلا ولگاریس*

کشت خالص جلبک *Chlorella vulgaris* مورد استفاده در این تحقیق، از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه گردید. سلول های جلبکی با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش شدند تا به میزان مورد نیاز برای هر تیمار مورد استفاده قرار گیرند (Guillard, 1973).

تیماربندی ماهیان

جهت تیماربندی، تعداد ۷۲۰ عدد از ماهیان در قالب ۴ تیمار مختلف، هر کدام با ۳ تکرار و با تراکم ۶۰ عدد ماهی در ۱۲ حوضچه تقسیم بندی شدند. سایر ماهیان نیز در حوضچه‌ی ذخیره، نگهداری شدند. ۳ تیمار به عنوان تیمارهای آزمایشی و یک تیمار به صورت گروه کنترل در نظر گرفته شد. تیمارها از لحاظ میزان کلرلای دریافتی در غذا با هم تفاوت داشتند به گونه ای که ماهیان تیمار شاهد، و تیمارهای یک (T1)، دو (T2) و سه (T3) به ترتیب مقدار کلرلایی برابر با ۰ Cell /ml، ۱×۱۰^{۸}، ۲×۱۰^{۷} و ۳×۱۰^{۶} کلرلا به ازای هر ۴۵۰ گرم غذا، دریافت نمودند.

تهیه غذا و غذادهی

غذای مورد نیاز هر تیمار با افزودن میزان مشخص کلرلای تعیین شده برای هر تیمار، هر ده روز یک بار تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه غذا، ابتدا میزان مورد نیاز غذای پایه (بیومار، فرانسه) با توجه به وزن ماهیان هر تیمار و دمای آب توزین گردید و آسیاب شد. به طوریکه غذای مورد نیاز برای هر تیمار با تکرارهایش، طی ۱۰ روز، ۴۵۰ گرم تعیین شد. سپس جلبک به میزان معین و بر مبنای مقدار مشخص شده برای هر تیمار رقیق گردید و به غذا افزوده شد. پس از افزودن جلبک به غذا، خمیر حاصله از مخلوط غذا و جلبک در سینی آلومینیومی پخش و در آون قرار داده شد تا خشک شود. غذادهی نیز به مدت ۸ هفته و ۲ بار در روز طی ساعات ۸ صبح و ۲ بعدازظهر انجام شد. غذادهی در ۲ هفته اول، به میزان ۸ درصد وزن بدن و در ۳ هفته بعد و نیز ۳ هفته آخر به ترتیب به میزان ۶ درصد و ۴ درصد وزن بدن صورت گرفت.

تهیه نمونه ویروسی (سوپرناتانت)

از آنجائی که بیماریزایی ویروس عامل بیماری نکروز عصبی ویروسی در کفال ماهیان دریای خزر در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (Zorriehzahra *et al.*, 2004)، نمونه ویروسی (سوپرناتانت) جهت تزریق به ماهیان و انجام مواجه سازی اولیه از نمونه های چشم و مغز کفال ماهیان دارای علائم بیماری و بر اساس دستورالعمل اجرائی طرح ملی نکروز عصبی ویروسی VNN تهیه گردید (Zorriehzahra *et al.*, 2012; Kokawa, 2008).

بررسی قابلیت بیماریزایی نمونه ویروسی (سوپرناتانت) تهیه شده

جهت بررسی قابلیت بیماریزایی نمونه ویروسی تهیه شده از کفال ماهیان بیمار، مواجه سازی اولیه ویروس با ۳۰ عدد از بچه ماهی آزاد دریای خزر نگهداری شده در استخر ذخیره و نیز ۳۰ عدد ماهی گوپی، پس از طی شدن دوره سازگاری، انجام شد. مواجه سازی در سالنی کوچک انجام شد تا شرایط امنیت زیستی به طور کامل در آن قابل اجرا باشد. در نهایت آب مورد استفاده در سالن، از طریق کلر زنی ضدعفونی و به چاه های فاضلاب مرکز انتقال یافت. نتایج تاثیر نمونه ویروسی بر هر دو گونه از ماهیان طی ۱۰ روز مورد پایش و مراقبت لازم قرار گرفت و علائم احتمالی و مرگ و میر ماهیان ثبت شد (Zorriehzahra *et al.*, 2013). مواجه سازی ویروس با بچه ماهی آزاد دریای خزر از طریق تزریق نمونه ویروسی با استفاده از

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

سرنگ انسولین یک سی سی به صورت داخل صفاقی در تعدادی از ماهیان آزاد که از حوضچه ذخیره انتخاب شده بودند، انجام شد. ماهیان گوپی نیز به شیوه حمام دادن در معرض ویروس قرار گرفتند (Zorriehzahra *et al.*, 2013). دلیل انتخاب ماهی گوپی این بود که این ماهی از جمله ماهیان مستعد و حساس به ابتلای به VNN است (Hegde *et al.*, 2003؛ Zorriehzahra *et al.*, 2013). مشاهده مرگ و میر و علائم بیماری در ماهی گوپی حساس به VNN نشانه مناسب بودن سوپرناتانت تهیه شده جهت القای بیماری در ماهی است.

مواجه سازی نهایی ماهیان با نمونه ویروسی (سوپرناتانت)

مواجه سازی نهایی در بچه ماهیان آزاد، پس از پایان ۸ هفته تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف کلرلا انجام شد. جهت مواجه سازی نهایی، نمونه ویروسی تهیه شده از ۳ روز قبل، از فریزر خارج گردید و در دمای اتاق ذوب شد. سپس با استفاده از سرنگ انسولین به میزان ۱ میلی لیتر نمونه ویروسی حاوی 10^7 ذره ی ویروسی به هر ماهی تزریق شد که ۱۰ عدد ماهی از هر یک از تیمارها به صورت تصادفی (مجموعا ۴۰ عدد ماهی از همه تیمارها) انتخاب و تزریق برای آن‌ها انجام شد (Husgarõ *et al.*, 2001) و تا ۱۴ روز پس از تزریق، بروز علائم احتمالی بیماری و میزان مرگ و میر، در آنها مورد پایش و مراقبت لازم قرار گرفت.

خونگیری، تهیه سرم خون و اندازه گیری فراسنجه های ایمنی

خونگیری در دو مرحله، مرحله اول در پایان ۸ هفته و قبل از مواجه سازی ماهیان با ویروس (جهت تعیین تاثیر جلبک بر فراسنجه های ایمنی ماهی) و مرحله دوم، ۱۴ روز بعد از مواجه سازی (جهت تعیین اثرات ویروس بر فراسنجه های ایمنی ماهیان تیمارهای مختلف) انجام شد. ماهیان ۱روز قبل از خونگیری قطع غذا شدند ابتدا ماهیان با استفاده از عصاره گل میخک به میزان نیم میلی لیتر در هر لیتر آب، بیهوش شدند (Zorriehzahra *et al.*, 2013) . سپس خونگیری از ناحیه ساقه دمی انجام شد (Mozanzadeh *et al.*, 2015). نمونه خون جمع آوری شده از طریق سرنگ غیر هپارینه به داخل ویال های غیر هپارینه انتقال داده شد تا لخته خون تشکیل گردد. ویال ها نیز بلافاصله در سانتریفیوژ یخچال دار (Koukusan H-18, Japan) قرار داده شدند و سرم خون، به مدت ۵ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه جداسازی شد. سرم جدا شده نیز با استفاده از میکروپیپت جمع آوری شد و تا زمان آنالیز در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد، قرار داده شد (Mozanzadeh *et al.*, 2015). فراسنجه های ایمنی مورد بررسی شامل پروتئین تام (TP)، آلبومین (Alb)، IgM، C_3، C_4، انفجار تنفسی و لیزوزیم بودند که جهت تعیین آنها از دستگاه اتوآنالایزر (Eurolyser AU-01 , Austria) و کیت های آزمایشگاهی (پارس آزمون، تهران، ایران) استفاده شد (Torfi Moazenzadeh *et al.*, 2015).

آسیب شناسی

جهت انجام بررسی‌های آسیب شناسی، نمونه ماهیان مورد نظر به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول بوئن (شامل ۷۰ درصد اسید اشباع شده، ۲۵ درصد فرمالین تجاری و ۵ درصد اسید استیک) تثبیت و برای نگهداری، در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از انجام مراحل معمول آسیب شناسی (ثبوت، آبگیری، شفاف سازی، قالب گیری، برش، رنگ آمیزی و مونته کردن) در آزمایشگاه اکولوژی دریای خزر، جهت انجام بررسی های مورد نظر از طریق پست پیشتاز (DHL) به آزمایشگاه رفرانس سازمان OIE در کشور ایتالیا ارسال و در آنجا برش هایی با ضخامت ۶-۴ میکرون از بافت‌های مغز و چشم تهیه و رنگ آمیزی شد (Roberts, 1978). روش رنگ‌آمیزی مورد استفاده در این مطالعه، هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بود.

کشت سلولی و آزمایش های مولکولی تائیدی

آزمایش Nested-RT-PCR

یکی از روش های توصیه شده مهم برای ردیابی نوداویروس روش Nested-RT-PCR است. بیشتر روش های PCR برای تکثیر قطعه کوچکی از ژن RNA_2 که پروتئین کپسید ویروس را کد می‌کند طراحی شده اند (Nishizawa *et al.*, 1994; Thiery *et al.*, 1999; Grotmol *et al.*, 2000; Skliris *et al.*, 2001). از طرفی با توجه به اختصاصی بودن و حساسیت کیت تجاری (IQ

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

2000, Taiwan) ، تمامی مراحل این آزمایش، بدون طراحی و بهره گیری از پرایمرهای خاص و با استفاده از کیت تجاری مزبور انجام شد. جهت انجام آزمایش مربوطه، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت IQ2000 ، ابتدا استخراج RNA از نمونه های مغز و چشم انجام شد و سپس آزمون های RT-PCR و Nested-PCR صورت گرفت و در نهایت الکتروفورز محصول PCR انجام شد.

آزمایش ایمونوفلورسنت IFAT

آزمایش IFAT با استفاده از بافت مغز و چشم در آزمایشگاه پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی (انزلی) و طبق دستورالعمل OIE، ۲۰۱۳ انجام شد.

آزمایش کشت سلول

دو مرحله جهت انجام کشت سلولی صورت گرفت که در مرحله اول تلقیح نمونه بر روی تک لایه سلولی SSN-1 و در مرحله دوم بررسی سلول های تلقیح شده، صورت گرفت. سلول های تلقیح شده به مدت ۱۰ روز در زیر میکروسکوپ اینورت برای مشاهده آثار آسیب سلولی(CPE)، بررسی گردید. آثار آسیب سلولی در تیره سلولی SSN-1 در صورت بروز آثار (CPE)، به صورت سلولهای گرانوله گرد یا باریک شده، حاوی واکوئل مورد انتظار بود (OIE, 2013).

نمونه ها جهت انجام آزمایش ایمونوهیستوشیمی به مرکز رفرانس سازمان OIE در کشور ایتالیا ارسال شد و آزمون مربوطه در آنجا انجام گرفت. در مشاهده میکروسکوپی نمونه های آلوده، موارد مثبت با رنگ قهوه ای طلایی مشخص می گردند (OIE, 2013).

آنالیز آماری داده ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها در رابطه با مقایسه تاثیر مقادیر مختلف جلبک بر فراسنجه های ایمنی ماهی آزاد دریای خزر از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-wayANOVA)، نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) و آزمون LSD استفاده شد. مقادیر به صورت میانگین± انحراف استاندارد (SE±Mean) بیان گردیدند. معنی داری آزمون ها با سطح اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون t-test برای مقایسه دوتایی و تعیین اثر مقادیر مختلف جلبک بر فاکتورهای مختلف استفاده شد. از ضریب همبستگی پیرسون نیز برای تعیین رابطه بین فراسنجه های سرمی استفاده گردید. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام شد.

نتایـج

نتیجه تزریق نمونه ویروسی (سوپرناتانت) به ماهیان تیمار شاهد (جهت بررسی قابلیت بیماریزایی نمونه ویروسی جداسازی شده از کفال ماهیان آلوده در بچه ماهیان آزاد دریای خزر) منفی بود و هیچگونه علامت بیماری یا مرگ و میر در بچه ماهیان آزاد مشاهده نشد اما همه ماهیان گوپی طی ۱۰ روز تلف شدند و علائمی همچون اگزوفتالمی و اتساع محوطه شکمی در آنها مشاهده شد.

نتایج بررسی فراسنجه های ایمنی پس از پایان ۸ هفته تغذیه در همه تیمارها (جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در فراسنجه های سرمی در اثر استفاده از جلبک *کلرلا ولگاریس* و همچنین نتایج بررسی فراسنجه های ایمنی، ۱۴ روز پس از مواجه سازی ماهیان همه تیمارها با ویروس (جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در فراسنجه های سرمی در اثر ورود ویروس و مقایسه تغییرات سرمی پس از تغذیه از جلبک هم در زمان قبل و هم بعد از مواجه سازی با ویروس) در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در فاکتورهای IgM و C_4 در زمان قبل و فاکتور C_3 در زمان بعد از تزریق بین تیمارهای مختلف است.

نتایج بررسی های مولکولی و انجام آزمون های RT-PCR، Nested-PCR ، IFAT، کشت سلولی و بررسی آثار CPE و آزمون IHC و در نهایت مطالعات آسیب شناسی، جهت بررسی حضور ویروس در بافت های مغز و چشم ماهی در شکل های ۱ تا ۴ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که بچه ماهی آزاد دریای خزر مقاوم در برابر NNV است و نشانه یا ردپایی از ویروس در

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

بافتهای ماهیان تیمارهای دریافت کننده کلرلا و نیز تیمار شاهد، یافت نشد زیرا در بررسی نتایج الکتروفورز محصول RT-Nested PCR باند ۶۶۵ bp تشکیل شد (شکل ۱) و باند ۲۸۹bp (کنترل مثبت) تشکیل نگردید که این امر نشان دهنده عدم وجود ویروس و منفی بودن این آزمون است. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، مشاهده باندهای ۲۸۹bp و ۴۷۹bp در بیماری با حدت متوسط و باندهای ۲۸۹bp و ۶۶۵bp در حدت خفیف بیماری مشاهده می شود و در نمونه های منفی نیز تنها باند ۶۶۵ bp به تنهایی دیده خواهد شد. همچنین در بررسی نتایج آزمون IFAT نقاط طلایی براق که نشان دهنده حضور ویروس است، مشاهده نشد (شکل ۲)، آثار CPE نیز در کشت سلولی مشاهده نگردید (شکل ۳). همچنین علاوه بر عدم مشاهده نشانه های شاخص بیماری، لکه های قهوه ای طلایی که معرف تشکیل کمپلکس پادگن- پادتن و نیز آثار واکوئولاسیون در پی انجام آزمون IHC و انجام بررسی‌های آسیب شناسی (شکل ۴)، مشاهده نگردید.

جدول ۱. اثر غلظتهای مختلف جلبک *C. vulgaris* بر برخی پارامترهای ایمنی بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*) در زمان قبل و بعد از مواجه سازی آنها با ویروس (n =۳۶)

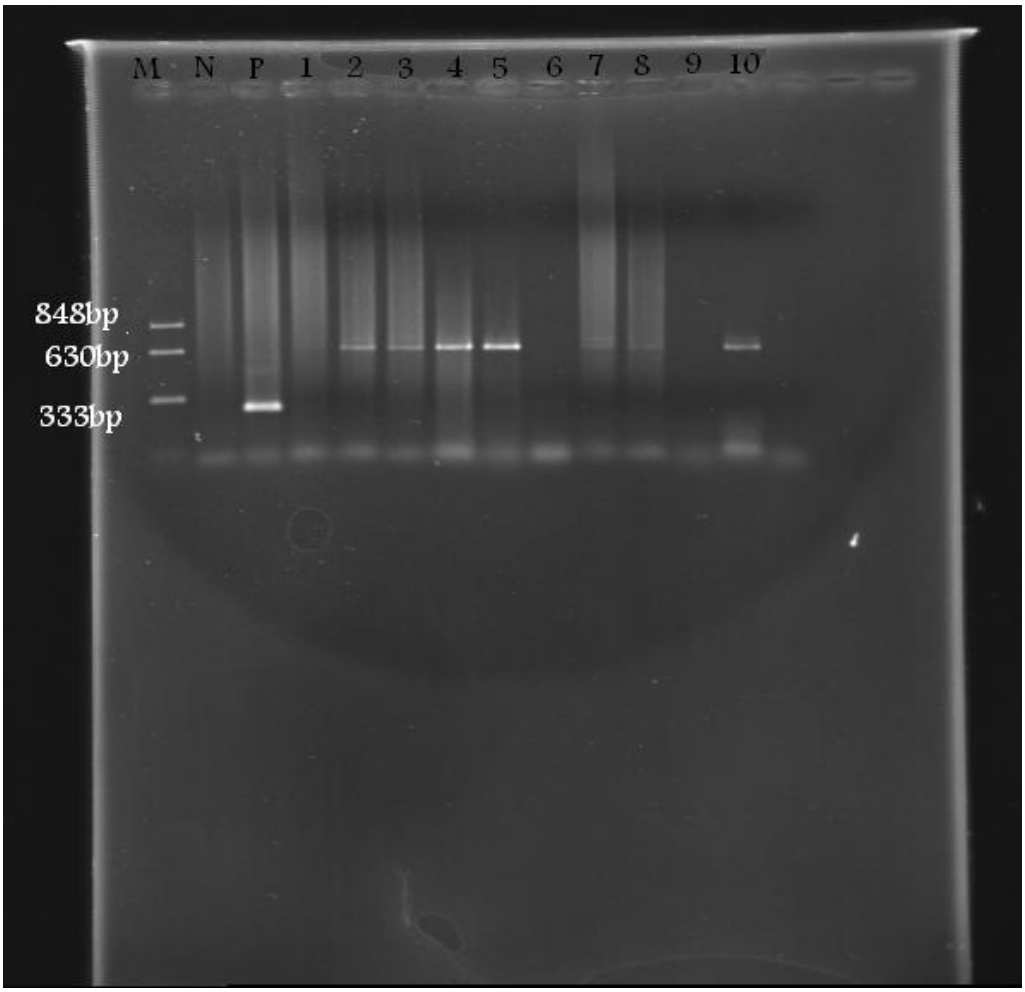
فاکتور ایمنی		T_1	T_2	T_3	Control
Respiratory Burst	قبل	۱۳۱۴±۶۵	۱۴۹۱±۱۱۹	۱۲۷۹±۹۱	۱۴۸۲±۱۶۸
	بعد	۲۸۳۰ ±۲۰۶	۲۱۲۹±۲۱۱	۲۷۴۴±۳۲۴	۳۰۶۴±۱۰۲
	Sig.	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰
	r	۰/۴۳۰	-۰/۰۹۵	-۰/۱۷۲	۰/۲۸۲
IgM* (mg L^{-1})	قبل	۱۷۰/۴۶±۵/۹۰ ^{a}	۱۴۲/۲۳±۱۱/۴۵^{b}	۱۲۹/۳۶±۹/۴۵^{bc}	۱۰۷/۵۶±۱۰/۲۵^{c}
	بعد	۸۲/۹۶±۴/۶۹^{a}	۸۲/۱۸±۵/۲۳^{a}	۸۳/۲۰ ±۶/۳۴^{a}	۱۳۱/۱۶±۹/۵۸^{b}
	Sig.	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۲۴	۰/۲۲۴
	r	۰/۷۱۴	-۰/۴۳۴	-۰/۶۷۰	-۰/۶۶۸
C_3* (mg L^{-1})	قبل	۲۸/۸۱±۲/۵۷	۳۵/۳۵±۳/۴۲	۲۹/۶۰ ±۱/۴۵	۲۹/۹۵±۳/۳۲
	بعد	۴۰/۸۱±۴/۲۲^{a}	۲۷/۵۵±۱/۳۸^{b}	۲۰/۹۳±۱/۳۴^{b}	۵۰/۴۰ ±۳/۹۵^{c}
	Sig.	۰/۰۱۰	۰/۰۶۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۲
	r	۰/۷۱۰	۰/۲۴۴	-۰/۰۵۹	۰/۵۳۸
C_4* (mg L^{-1})	قبل	۳۴/۸۸±۵/۲۹^{a}	۲۹/۲۵±۴/۸۴^{a}	۲۴/۵۰ ±۱/۰۶^{a}	۱۹/۵۱±۱/۷۷^{b}
	بعد	۱۶/۲۸±۱/۶۵	۱۶/۴۶±۱/۱۹	۱۷/۲۳±۱/۸۵	۱۷/۹۱±۱/۸۰
	Sig.	۰/۰۲۴	۰/۰۲۸	۰/۰۱۵	۰/۵۵۸
	r	-۰/۱۷۹	۰/۶۳۹	۰/۱۲۹	-۰/۰۱۳
Alb (gL^{-1})	قبل	۲/۲۳±۰/۱۵	۱/۹۰ ±۰/۰۶	۱/۹۸±۰/۰۷	۲/۱۳±۰/۲۱
	بعد	۲/۶۸±۰/۲۱	۲/۰۸±۰/۱۰	۱/۹۵±۰/۲۲	۲/۸۴±۰/۲۷
	Sig.	۰/۱۰۸	۰/۱۵۰	۰/۸۴۲	۰/۱۳۵
	r	۰/۲۸۵	۰/۲۴۱	۰/۹۴۵	۰/۷۰۴
TP (gL^{-1})	قبل	۳/۸۶±۰/۲۶	۳/۶۶±۰/۱۲	۳/۹۵±۰/۴۵	۳/۶۳±۰/۱۹
	بعد	۴/۳۳±۰/۶۰	۳/۴۱±۰/۲۱	۳/۰۳±۰/۱۰	۳/۸۸±۰/۳۷
	Sig.	۰/۳۸۹	۰/۲۶۹	۰/۱۰۱	۰/۴۳۲
	r	۰/۵۹۴	۰/۳۸۹	۰/۱۱۴	۰/۶۲۰
Lysozyme (IU/ml)	قبل	۱/۲۴±۰/۱۷	۱/۳۱±۰/۳۷	۱/۶۱±۰/۲۱	۱/۲۳±۰/۱۵
	بعد	۳/۱۸±۰/۸۲	۲/۱۸±۰/۵۸	۱/۵۹±۰/۴۹	۱/۷۰ ±۰/۱۵
	Sig.	۰/۰۷۴	۰/۱۴۳	۰/۹۷۹	۰/۰۳۳
	r	-۰/۰۹۶	۰/۵۳۴	-۰/۳۵۸	۰/۴۹۰

* در هر ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار حداقل بین۲ تیماردر زمان قبل و بعد از مواجه سازی با ویروس است ($P<0.05$). حروف مختلف در یک ردیف، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در فاکتور مورد بررسی در تیمارهای مختلف است.T_1 = تیمار۱، T_2 = تیمار ۲، T_3 = تیمار ۳، r= ضریب

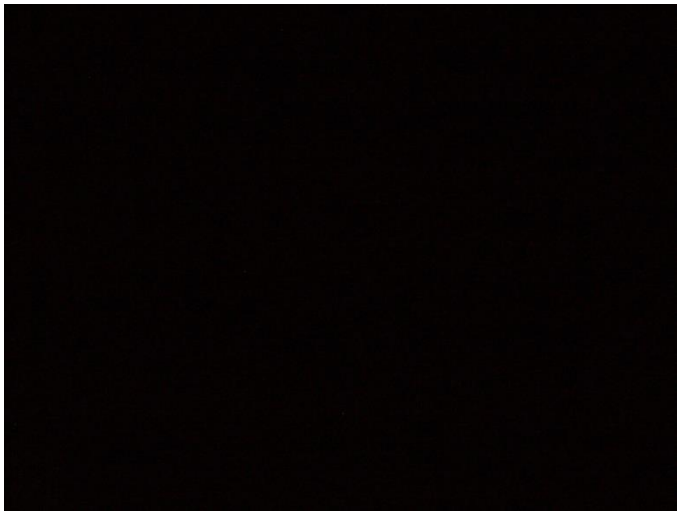
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

پیرسون یک فاکتور قبل و بعد از مواجه سازی با ویروس. ردیف Sig نیز وجود اختلاف معنی دار در یک فاکتور را در زمان‌های قبل و بعد از مواجه سازی نشان می دهد که Sig های کوچک تر از ۰/۰۵ نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



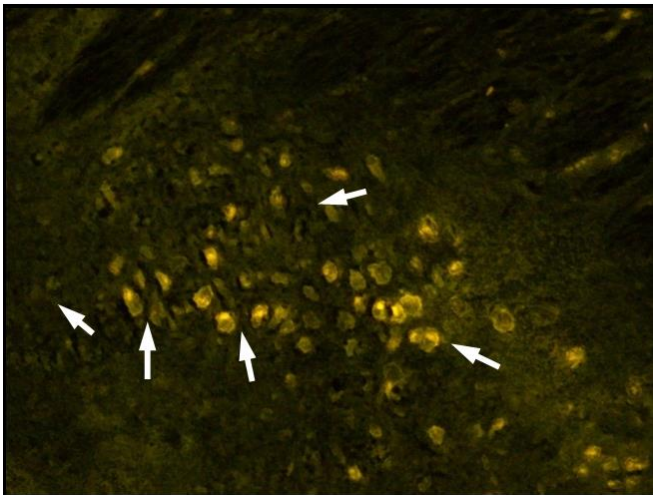
شکل ۱. نتایج *Nested- RT-PCR* نمونه های مغز و چشم ماهی آزاد دریای خزر. از چپ به راست: مارکر (*bp* ۸۴۸ ، *bp* ۶۳۰ و *bp* ۳۳۳) ، کنترل منفی، کنترل مثبت، *bp* ۲۸۹ ، ۱۰ نمونه منفی (*bp* ۶۶۵).



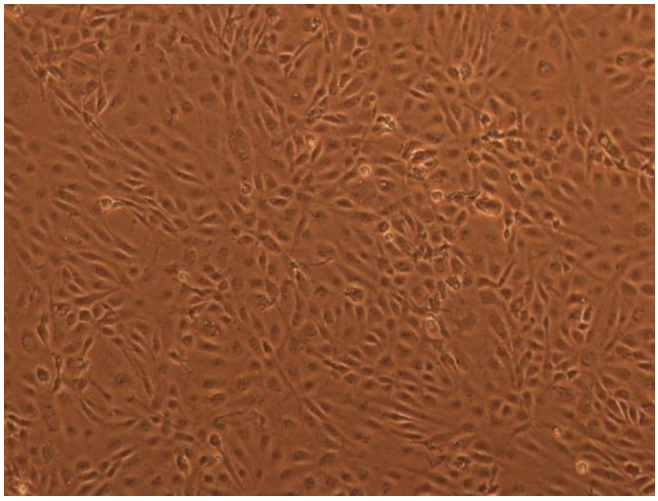
شکل ۲. پاسخ منفی در آزمایش IFAT مربوط به نمونه بچه ماهی آزاد دریای خزر (عدم وجود نقاط طلایی براق)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

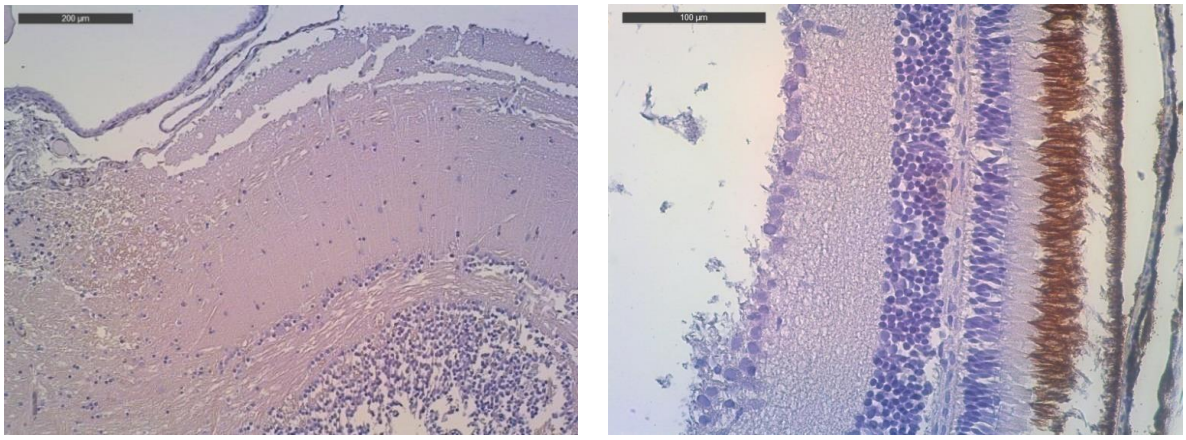
[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]



شکل ۳. یک نمونه مثبت از آزمایش IFAT در سایر مطالعات قبلی محققین (Ghasemi *et al*., 2013).
مقطع بافت مغز میانی ماهی کفال طلایی (*L. auratus*) آلوده به بتانوداویروس. نقاط طلایی درخشان حاکی از واکنش پادگن - پادتن در لایه خاکستری قشر مغز است. (پیکان ها) (عدسی x ۱۰، H&E).



شکل ۴. عدم مشاهده آثار CPE [که برای Nodavirus به شکل حفره ای شدن (Vacoulation) می باشد] در سلول SSN-1 تلقیح شده با نمونه چشم و مغز ماهی آزاد دریای خزر



شکل ۵. عدم حضور واکوئولاسیون در مقطع بافت شبکیه چشم (راست) و مغز (چپ) بچه ماهی آزاد (*S. trutta caspius*) (H&E, x40)

بحث

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

با توجه به تائید وقوع بیماری VNN در ماهی کفال طلایی در دریای خزر (Zorriehzahra *et al*., 2005; 2016) و نیز اثبات قابلیت بیماریزایی ویروس NNV در تاس ماهی روس (*Acipenser gueldenstaedtii*) (Xylouri *et al*., 2007; Athanassopoulou *et al*., 2004)، طی سال های اخیر نگرانی هایی در رابطه با انتقال بیماری از کفال ماهیان آلوده دریای خزر به سایر گونه های بومی با ارزش ایجاد شده است. بر این اساس، در این تحقیق قابلیت بیماریزایی ویروس مسبب VNN در ماهی آزاد دریای خزر نیز مورد بررسی قرار گرفته است زیرا ماهی آزاد دریای خزر هم از جنبه زیست محیطی به عنوان گونه بومی دریای خزر که در معرض خطر انقراض است (Coad, 2000) اهمیت دارد و هم با توجه به تلاشهایی که جهت اهلی نمودن این گونه بومی و معرفی آن به صنعت آبزی پروری کشور شده است، به عنوان یکی از کاندیداهای مناسب جهت تکثیر و پرورش در آبهای داخلی ایران مطرح است، از این رو بررسی شرایط ایجاد بیماری در آن برای مدیریت بهتر مزارع تکثیر و پرورش آن، اهمیت بسزائی دارد.

از طرفی طی تحقیق حاضر تلاش گردیده است تا تاثیر جلبک *کلرلا ولگاریس* به عنوان یک عامل طبیعی که خاصیت ضد ویروسی و محرک سیستم ایمنی آن در برخی مطالعات (Kim *et al*., 2007; Badwy *et al*., 2008; Xu *et al*., 2014) به اثبات رسیده است و قابلیت تکثیر و کشت آن نیز در ایران به آسانی وجود دارد، بر روی رشد و تحریک سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان از این پتانسیل به نحو شایسته ای در راستای ارتقای شرایط پرورش، رشد و کنترل بیماری در ماهی آزاد دریای خزر و یا سایر ماهیان استفاده نمود. بنابراین تحقیقی طراحی شد تا با انجام مواجه سازی ویروس با ماهی آزاد دریای خزر و بررسی های ایمنی، مولکولی و آسیب شناسی دقیق، حضور احتمالی این ویروس در بافتهای هدف ماهی مورد مطالعه قرار گیرد و در نهایت به نگرانی ها و ابهامات موجود در زمینه قابلیت انتقال بیماری و بیماریزایی ویروس عامل مرگ و میر کفال ماهیان دریای خزر به ماهی آزاد دریای خزر پاسخ داده شود. از طرفی تاثیر جلبک *کلرلا ولگاریس* که در ۳ دوز مختلف (۱×۱۰^{۸}، ۲×۱۰^{۷} و ۳×۱۰^{۶}) جهت تغذیه بچه ماهیان آزاد دریای خزر مورد استفاده قرار گرفت، نیز بر فراسنجه های ایمنی ماهی چه در شرایط قبل از مواجه شدن با ویروس و چه پس از آن، مورد پایش قرار گرفت تا تاثیر این میکروجلبک بر ارتقای کارایی سیستم ایمنی آن مشخص گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ویروس VNN قابلیت ایجاد بیماری در بچه ماهی آزاد دریای خزر را ندارد و این ماهی در برابر ویروس مذکور، مقاوم است. از طرفی جلبک *کلرلا ولگاریس* در صورت استفاده به میزان مناسب، سبب بهبود و ارتقای شرایط ایمنی این ماهی می گردد که در ادامه نتایج به دست آمده به تفکیک مورد بحث و بررسی قرار می گیرند.

فراسنجه های ایمنی

با بررسی روند تغییرات فراسنجه های ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر، مشخص شد که جلبک *کلرلا ولگاریس* می تواند به عنوان محرک سیستم ایمنی این ماهی عمل نماید و موثرترین دوز جهت بهبود کارایی سیستم ایمنی این ماهی، دوز به کار رفته در تیمار ۱ (۱×۱۰^{۸} Cell/ml) کلرلا به ازای هر ۴۵۰ گرم غذا) بود. هر چند برخی فراسنجه های ایمنی تغییرات فاحشی را طی دوره آزمایش نشان ندادند اما میزان IgM و C_4 در ماهیان تیمارهای دریافت کننده *کلرلا ولگاریس* (تیمارهای ۱، ۲ و ۳) بیشتر از تیمار شاهد بود و میزان IgM در تیمارهای ۱ نیز به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود ($P<0.05$). در مقایسه روند تغییرات IgM در زمان قبل و بعد از مواجه سازی با ویروس مشخص شد که میزان این فراسنجه در ماهیان تیمارهای دریافت کننده کلرلا کاهش معنی داری داشته است ($P<0.05$) و در ماهیان تیمار شاهد، افزایش یافته، هرچند که این افزایش معنی دار نبوده است اما به طور معنی داری بیشتر از میزان IgM ماهیان تیمارهای ۱، ۲ و ۳ در زمان بعد از مواجه سازی با ویروس بوده است ($P<0.05$). به نظر می رسد که دلیل این امر آن است که ماهیانی که از جلبک *کلرلا ولگاریس* استفاده نموده اند، به جهت اینکه سیستم ایمنی شان طی زمان استفاده از جلبک (قبل از مواجه سازی) تحریک شده بود، آماده مقابله با ویروس بودند و مواجه سازی با ویروس سبب مصرف IgM تولید شده از قبل، گردید اما سیستم ایمنی هومورال در گروه شاهد هنوز فعال نشده بود و پس از مواجه شدن با ویروس و در نتیجه تحریک شدن سیستم ایمنی ماهیان این تیمار، شروع به تولید IgM نمود و این IgM در زمانی طولانی تر در ادامه مصرف خواهد شد که به دلیل اینکه مقدار این فراسنجه در تیمار شاهد تنها در پایان زمان ۱۴ روز پس از مواجه سازی اندازه گیری شد، نمی توان نظر قطعی در رابطه با

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

مصرف میزان IgM تیمار شاهد در زمانی طولانی تر از ۱۴ روز اظهار نمود اما از آنجائیکه افزایش IgM نشان دهنده بهبود کارایی سیستم ایمنی ماهی است (Andersson *et al*., 1995)، به نظر می رسد که تزریق ویروس به عنوان یک عامل تحریک کننده سیستم ایمنی ماهی عمل نموده و سبب شده تا میزان IgM ماهیان تیمار شاهد پس از مواجه سازی با ویروس و دیرتر از ماهیان ۳ تیمار دیگر که قبلا با دریافت کلرلا سیستم ایمنی شان تحریک شده بود، افزایش یابد زیرا تولید ایمنوگلوبین اختصاصی یا IgM در ماهیان استخوانی، می تواند از طریق مواجه مستقیم با ویروس یا سوسپانسیون ویروسی و باکتریهای خارج سلولی اتفاق بیافتد و به طور غیرمستقیم از طریق سلول های آلوده به ویروس و سایر پاتوژن های داخل سلولی نیز حاصل می شود (Aoki *et al*., 2008; Balfry and Higgs, 2001). افزایش IgM سرم ماهی با مصرف میکروجلبک، در مطالعات دیگری نیز به صورت مشابه با نتیجه تحقیق حاضر گزارش شده است (Amaninejad *et al*., 2013). تغییرات ایمونوگلوبین در سرم خون بچه ماهی آزاد دریای خزر پس از مصرف کلرلا، نشان دهنده اثر کلرلا بر تحریک سیستم ایمنی این ماهی است و کاهش آن در تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ و افزایش آن در تیمار شاهد پس از مواجه شدن با ویروس، نشان دهنده اثر مثبت آن جهت مقابله با ویروس است. نتایج سایر مطالعات با تأیید این مطالعه نشان داده اند که میکروجلبک ها عواملی موثر در افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهیان مختلف هستند که از آن جمله می توان به میکروجلبک‌هایی همچون *Spirulina platensis* (Ibrahim *et al*., 2013)، *Nannochloropsis oculata* (Yanuhar *et al*., 2011)، *Chlorella minutissima* (Katharios *et al*., 2005)، *C. vulgaris* (Xu *et al*., 2014) و نیز *Dunaliella salina* (Amaninejad *et al*., 2013) اشاره نمود.

احتمالا آنچه سبب می گردد که *کلرلا ولگاریس* به عنوان محرک سیستم ایمنی در این ماهی عمل نماید به وجود ترکیبات آن خصوصا رنگدانه کاروتنوئید (Gouveia *et al*., 2006) و انواع ویتامین ها (Safi *et al*., 2014)، مرتبط است. به طوری که ثابت شده کروموتافورهای کاروتنوئیدی همچون بتا-کاروتن در جلبک *Dunaliella salina* و آستاگزانتین در جلبک *Phaffia rhodozyma* سبب افزایش فعالیت کمپلمان و لیزوزیم در ماهی قزل آلای رنگین کمان می گردد (Amaninejad *et al*., 2013). همچنین استفاده از غذای حاوی جلبک *Dunaliella*، سبب افزایش میزان ایمونوگلوبولین پلاسمای ماهی قزل آلای رنگین کمان می گردد (Amar *et al*., 2004). ویتامین ها نیز به عنوان آنتی اکسیدان عمل می نمایند و در بهبود کارایی سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری در ماهیان تاثیر مثبتی دارند (Amer *et al*., 2011). از این رو با توجه به وجود انواع ترکیبات رنگدانه ای همچون بتا-کاروتن، آستاگزانتین، کانتاگزانتین، لوتئین و نیز مقادیر مختلفی از ویتامین هایی همچون ویتامین C، ویتامینE، ویتامین A و انواع ویتامین های گروه B در جلبک *کلرلا ولگاریس* (Safi *et al*., 2014)، این جلبک می‌تواند به عنوان عامل موثری در بهبود کارایی سیستم ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر نیز عمل نماید چرا که این ترکیبات (رنگدانه ها و ویتامین ها) در کنار انواع ویژگی های مفید و درمانی که دارند (Safi *et al*., 2014)، به عنوان آنتی اکسیدان (Gouveia *et al*., 2006) و همچنین بهبود دهنده کارایی سیستم ایمنی (Cha *et al*., 2008; Tanaka *et al*., 1984) عمل می نمایند.

با توجه به روند تغییرات مشاهده شده در فاکتور C_3، مشخص است که جلبک مصرفی در مدت زمان مورد بررسی و مقادیری که مصرف گردید، تاثیری بر تغییرات این فاکتور نداشته است زیرا میزان C_3 در زمان قبل از تزریق ویروس، تفاوت معنی داری را بین تیمارهای دریافت کننده کلرلا (۲،۱و ۳) و تیمار شاهد نشان نداد. از طرفی تزریق ویروس سبب مشاهده تغییرات معنی دار بین تیمارها (به جز تیمارهای ۲ و ۳) شد. همچنین تغییر میزان فاکتور C_3 در زمان قبل و بعد از تزریق ویروس معنی دار بود که این امر نشان دهنده تاثیر ویروس بر تغییرات این فاکتور است.

تاثیر استفاده از جلبک *کلرلا ولگاریس* در غذای بچه ماهی آزاد دریای خزر بر میزان فاکتور C_4 کاملا مشهود است زیرا میزان این فاکتور در تیمارهای دریافت کننده کلرلا به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بوده است ($P<0.05$). همچنین هر چند تزریق ویروس سبب کاهش این فاکتور در همه تیمارها شد اما تغییر معنی داری بین فاکتورهای مختلف مشاهده نشد که احتمالا نشان دهنده مصرف C_4 در مواجه شدن با ویروس است. روند تغییرات این فاکتور در مقایسه دو تایی در زمان های قبل و بعد از تزریق ویروس، کاهش معنی داری را بین تیمارهای دریافت کننده کلرلا نشان داد ($P<0.05$).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

سیستم کمپلمان اساساً به منظور حفاظت بدن پدید آمده است. این سیستم ۳ نقش عمده در دفاع میزبان ایفا می‌کند. نخستین نقش آن پوشانیدن ارگانیسم‌های بیماریزا و کمپلکس‌های ایمنی با اپسونین‌ها می‌باشد که به انهدام آنها توسط بیگانه خوارها منتهی خواهد شد. نقش دیگر کمپلمان، فعال کردن سلول‌های التهابی و نقش آخر آن‌ها کشتن سلول‌های هدف می‌باشد. کمپلمانهای C_3 و C_4 که ترکیباتی از مکانیسم دفاع غیراختصاصی به حساب می آیند، در ماهی بسیار مهم هستند زیرا در صورتیکه این ترکیبات در سرم خون بالا باشند، نشان دهنده سلامت ماهیان است (Yano, 1992). از این رو افزایش C_4 در اثر دریافت کلرلا نشان دهنده تاثیر مثبت استفاده از *کلرلا ولگاریس* بر سلامت بچه ماهی آزاد دریای خزر و بیانگر قابلیت مناسب این جلبک در تحریک سیستم ایمنی ماهی مورد نظر است.

به طور کلی نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که ماهیان در مواجه شدن با ویروس، شروع به مقاومت در برابر آن نمودند به طوری که افزایش معنی داری در میزان فاکتور انفجار تنفسی در زمان بعد از تزریق در مقایسه با زمان قبل از تزریق ویروس مشاهده شد ($P<0.05$) اما میزان این فاکتور در تیمارهای مختلف در زمان های قبل و بعد از تزریق، تفاوت معنی داری با هم نداشتند ($P>0.05$). به نظر می رسد که جلبک *کلرلا ولگاریس* تاثیری بر افزایش فاکتور انفجار تنفسی نداشته است زیرا در زمان قبل از تزریق تفاوت معنی داری بین تیمارهای دریافت کننده جلبک و تیمار شاهد که جلبکی دریافت ننمودند، مشاهده نشد. اما تزریق ویروس سبب شد تا میزان انفجار تنفسی در همه تیمارها به طور معنی داری افزایش یابد و در واقع تزریق ویروس سبب تحریک ماهیان همه تیمارها گردید و باعث شد تا میزان فاکتور انفجار تنفسی افزایش یابد. اما طی تحقیقات دیگری اثرات موثر جلبک بر افزایش فاکتور انفجار تنفسی مشاهده شد به طوری که Kim و همکاران (۲۰۱۳a)، Watanuki و همکاران (۲۰۰۶)، Abdel-Tawwab و Ahmad (۲۰۰۹) و Kim و همکاران (۲۰۱۳ b) دریافتند جلبک اسپیرولینا سبب افزایش معنی دار فعالیت انفجار تنفسی به ترتیب در کفشک ژاپنی (*P. olivaceus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) و طوطی ماهی (*Oplegnathus fasciatus*) می شود. به نظر می رسد که دلایل این اختلاف در تاثیر جلبک بر فاکتور انفجار تنفسی در این بررسی و سایر تحقیقات بیان شده به عوامل مختلفی از جمله گونه ماهی، گونه جلبک مصرفی و میزان جلبک استفاده شده ارتباط داشته باشد.

در رابطه با لیزوزیم تنها میزان لیزوزیم تیمار شاهد با تزریق ویروس در مقایسه با زمان قبل از تزریق، تغییر معنی داری یافت و تغییر معنی داری در روند تغییرات این فاکتور در زمان قبل و بعد از تزریق در تیمارهای دریافت کننده کلرلا مشاهده نشد. اما با این وجود میزان لیزوزیم ماهیان تیمار ۱ که بیشترین مقدار کلرلا را دریافت نموده بودند، روند افزایشی چشمگیری را در پیش گرفت که می تواند دلالت بر تاثیر جلبک کلرلا بر تحریک سیستم ایمنی این ماهی در دوز بالاتر داشته باشد. تاثیر کلرلا بر افزایش میزان لیزوزیم طی بررسی‌های دیگر به اثبات رسیده است به طوری که با افزایش میزان استفاده از کلرلا از ۰ تا ۲ درصد در غذای *Carassius auratus gibelio*، میزان لیزوزیم نیز به طور معنی داری، افزایش یافت (Xu *et al.*, 2014). لیزوزیم یک مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی است که به عنوان یک واسطه مناسب، به محافظت در برابر هجوم میکروب ها می پردازد (Saurabh and Sahoo, 2008). نتایج برخی تحقیقات دیگر نیز نشان داد که استفاده از جلبک اسپیرولینا سبب افزایش معنی دار لیزوزیم در کفشک زیتونی (Kim *et al.*, 2013a) می شود.

پروتئین‌های ویژه خون دارای اعمال بیولوژیکی متنوعی هستند؛ بعضی از آنها به عنوان ناقل، آنزیم، مهار کننده پروتئازها عمل می کنند و یا در ایمنی هومورال نقش دارند (Rasooli, 2009). یکی از این ترکیبات پروتئینی موجود در سرم خون ماهیان، آلبومین است. توتال پروتئین یا پروتئین تام نیز به مجموع پروتئین‌های موجود در خون اطلاق می شود که یکی از نقش‌های این ترکیبات، ایجاد پاسخ‌های ایمنی معین است زیرا در تولید آنتی بادی بسیار موثرند (Sattari, 2006). به طور کلی افزایش سطح پروتئین های سرم، شاخص مناسبی برای وضعیت دفاعی ایمنی ماهی می باشند. میزان بالای پروتئین سرم در نتیجه بهبود عملکرد کبد و دیگر اعضائی است که پروتئین پلاسما را می سازند اما در اغلب موارد، بیماری ها سبب کاهش توتال پروتئین خون(TP) می گردند (Yu *et al.*, 2006).

در بررسی انجام شده در رابطه با اثر پودر کلرلا بر برخی فراسنجه های ایمنی بچه ماهیان صخره ماهی کره ای (*Sebastess chlegeli*) مشخص شد که استفاده از کلرلا به میزان ۲ درصد سبب افزایش بیشتر این فراسنجه در مقایسه با دوزهای پایین تر

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

(۰، ۰/۵، ۱و ۱/۵ درصد) و نیز بالاتر (۴ درصد) می گردد که نتایج آن مشابه نتیجه تحقیق حاضر است (Bai *et al.*, 2001). نتایج تحقیق Xu و همکاران (۲۰۱۴) که در رابطه با تاثیر استفاده از کلرلا به میزان ۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶ و ۲ درصد بر فراسنجه های ایمنی گونه ای کپور ماهی (*Carassius auratus gibelio*) انجام شد، نشان داد که میزان پروتئین تام تیمار شاهد و تیمار با مصرف کمترین میزان کلرلا (۰/۴ درصد) تفاوت معنی داری ندارند و آلبومین نیز در بین تیمار شاهد و تیمارهای استفاده نموده از مقادیر ۰/۴، ۰/۸ و ۲ درصد کلرلا تفاوت معنی داری با هم ندارند. با توجه به نتایج تحقیقات ارائه شده در بالا، به نظر می رسد که دوز مشخصی از کلرلا می تواند سبب ایجاد تغییرات معنی دار پروتئین سرم ماهی گردد و مقادیر کمتر یا بیشتر از آن، تاثیر معکوس دارند.

در تحقیق حاضر نیز از آنجا که تغییرات مشاهده شده در پروتئین تام و آلبومین در زمان مورد بررسی معنی دار نبوده است، به نظر می رسد که جهت اظهار نظر قطعی در رابطه با تغییرات این دو فراسنجه، شاید نیاز است که بررسی و اندازه گیری آنها در مدت زمان طولانی ترِ استفاده از جلبک مورد نظر (بیش از ۸ هفته) و یا زمان طولانی تری پس از تزریق (بیش از ۱۴ روز) انجام شود. به طوریکه Bai و همکاران (۲۰۰۱)، ۱۲ هفته به استفاده از کلرلا پرداختند. هرچند که Xu و همکاران (۲۰۱۴)، طی ۶۰ روز به این مطالعه پرداختند.

دلایل مشاهده تغییرات در رابطه با تاثیر جلبک *کلرلا ولگاریس* بر فراسنجه های ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر و سایر ماهیان مورد بررسی در تحقیقات دیگر می تواند مربوط به تفاوت در گونه جلبک، گونه ماهی مورد بررسی، شرایط تغذیه، شرایط محیط زیست ماهی، سن و بسیاری عوامل دیگر که مغایر با شرایط آزمایش انجام شده در این تحقیق بوده است همچون دوز مصرفی کلرلا، شیوه مصرف آن و ... باشد. اما به طور کلی اغلب تحقیقات، استفاده از میکروجلبکهای مختلف را عاملی موثر در بهبود سیستم ایمنی ماهیان و افزایش مقاومت آنها در برابر بیماری دانسته اند (Adam, 1999).

زیرا محرک‌های سیستم ایمنی که جلبک کلرلا ولگاریس یکی از انواع این محرک ها به حساب می آید، از طریق افزایش پاسخ ایمنی ذاتی عمل می کنند (Austin and Brunt, 2009; Nayak, 2010) که در بسیاری از فراسنجه های بررسی شده در این تحقیق نیز مشاهده شد. به طور کلی وظایفِ فراسنجه‌های ایمنی همچون C_4، IgM، لیزوزیم و ... شامل افزایش اتصال میکروب ها به فاگوسیت ها، افزایش التهاب برای فعال ساختن کمپلمان، ایجاد لیز اسمزی یا مرگ آپوپتوتیک، تغییر در بار سطحی میکروب ها جهت تسهیل فاگوسیتوز شدن، اثرات همولیتیک و ضد ویروسی است (Kum and Sekkin, 2011) که در زمان استفاده از محرک های ایمنی همچون میکرو جلبک *کلرلا ولگاریس*، افزایش می یابند.

آسیب شناسی و آزمون های مولکولی و تائیدی (RT-PCR، Nested-PCR، IFAT، کشت سلولی و IHC)

در بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از بافتهای مغز و چشم ماهی آزاد دریای خزر در هیچیک از تیمارهای مورد بررسی پس از مواجه شدن با ویروس، علائمی همچون واکوئولاسیون که نشان دهنده آسیب بافتی باشد، دیده نشد. مطالعه و تشخیص اولیه بیماری نکروز عصبی ویروسی با مشاهده آثار واکوئولاسیون در مقاطع عصبی همچون بافت مغز، نخاع و شبکیه چشم انجام می گیرد و تایید تشخیص ویروس به روشهای سرولوژیک مانند پادتن های درخشان غیرمستقیم در گسترش بافت مغز و چشم ماهیان مبتلا و یا مقاطع بافتی پارافینه ماهیان مورد بررسی صورت می گیرد (Zorriehzahra *et al.*, 2013).

در این بررسی، عدم مشاهده آسیب های بافتی در کنار عدم مشاهده علائم بیماری، مرگ و میر و نیز عدم مشاهده نشانه های حضور ویروس که از طریق سایر بررسی ها همچون RT-PCR، Nested-PCR، IFAT و IHC مشخص شد، بیانگر نبود ویروس در بافت ها و آلوده نشدن بافت های بچه ماهی آزاد و در واقع مقاوم بودن بچه ماهی آزاد در برابر بیماری VNN است.

در بسیاری از تحقیقات که ماهیان مبتلا به بیماری VNN شده بودند، آسیب های بافتی، نکروز و واکوئوله شدن بافت عصبی مرکزی و شبکیه چشم مشاهده گردید که برخی از این گونه ها عبارتند از هامور ماهی هفت خط (*Epinephelus septemfasciatus*)، هامور لکه قرمز (*E. akaara*) (Tanaka *et al.*, 1998)، باس دریایی (Breton *et al.*, 2003; Maeno *et al.*, 2004)، تاس ماهی روس (Xylouri *et al.*, 2007)، هامور لکه نارنجی، باس دریایی آسیایی، سرخوی مانگرو، خامه ماهی (Maeno *et al.*, 2007) و گورخر ماهی (Zorriehzahra *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2008)، در همه این ماهی ها بروز VNN با انجام آزمایشات دقیق تر دیگر نیز به تائید رسید و تنها به مشاهدات آسیب شناسی اکتفا نشد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

نتایج همه این تحقیقات از نقطه نظر بروز بیماری VNN در گونه مواجه شده با ویروس، مغایر با نتیجه تحقیق حاضر بوده است. به طور کلی اغلب مطالعات موجود در زمینه این بیماری، به وقوع VNN در انواع ماهیان در مناطق مختلف دنیا اشاره نموده اند (Fukuda *et al.*, 1996; Tanaka *et al*., 1998; Chi *et al*., 2001; Breton *et al*., 2003; Maeno *et al*., 2004; Furasawa *et al*., 2006 ; Xylouri *et al.*, 2007; Vendramin; *et al*., 2013;) و در موارد اندکی همچون تحقیق حاضر، به مقاومت گونه های مختلف ماهی در برابر این بیماری اشاره شده است که از آن جمله می توان به مقاومت خرگوش ماهی (Maeno *et al*., 2007) و نیز ماهی اسکار در برابر این بیماری اشاره نمود (Zorriehzahra *et al.*, 2013).

در نهایت مجدداً تاکید می گردد که با توجه به منفی بودن همه آزمون های انجام شده و عدم مشاهده تغییرات بافت شناسی و آثار ویروس در بافت ها، نمونه ویروسی (سوپرناتانت) تهیه شده از کفال ماهیان طلایی بیمار به میزان 10^{7} ذره که به صورت داخل صفاقی تزریق شد، نتوانست در بچه ماهی آزاد دریای خزر ایجاد بیماری نماید. مکانیسم مقاومت این ماهی در برابر ویروس مسبب VNN ناشناخته است اما در صورت مشخص شدن این امر، شاید بتوان از آن، جهت کنترل این بیماری در سایر گونه ها نیز بهره برد.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که بچه ماهی آزاد دریای خزر (*S.trutta caspius*) نسبت به نمونه ویروسی (سوپرناتانت) جداسازی شده از ماهی کفال طلایی آلوده به NNV مقاوم است . در واقع ژنوتایپ RGNNV جدا شده از کفال ماهیان دریای خزر از بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN)، قابلیت بیماریزایی در بچه ماهی آزاد دریای خزر را ندارد. از سوی دیگر بهره گیری از 1×10^{8} Cell /ml جلبک کلرلا به ازای هر ۴۵۰ گرم غذا می تواند سبب تحریک سیستم ایمنی ماهی مذکور گردد.

تشکر و قدردانی

از همکاران پرتلاش و ریاست محترم سابق و فعلی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (ساری) به خاطر مساعدت جهت انجام تحقیق حاضر در آن پژوهشکده و سرکارخانم دکتر Anna Toffan به جهت انجام آزمایشات آسیب شناسی و IHC در مرکز رفرانس OIE ایتالیا، صمیمانه تشکر می گردد.

منابـع

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, H.M. 2009. Live *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) as growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research. 40: 1037-1046.

Adachi, K., Ichinose, T., Watanabe, K., Kitazato, K., Kobayashi, N. 2008. Potential for the replication of the betanodavirus redspotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines. Archive Virology. 153(1): 15-24.

Adam, M. 1999. The promotive effect of the cyanobacterium Nostocmuscorum on the growth of some crop plants. Acta Microbiologica Polonica. 48: 163-171.

Amaninejad, P., Emadi, H., Emtiazjoo, M., Hosseinzadeh Sahhafi, H. 2013. Effects of Dunaliella microalgae (*Dunaliella salina)* on different level of IgM Immunoglobulin in rainbow trout (*Oncrohynchus mykiss)*. Global Journal of Biodiversity Science and Management. 3(2): 237-242.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Japan. pp: 527-537.

Amer, K. 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. Aquaculture Nutrition. 17: 98-115.

Andersson, E., Peixoto, B., Tormanen, V., Matsunaga, T. 1995. Evolution of the immunoglobulin M constant regiongenes of salmonid fish, rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) and Arctic charr (*Salelinus alpinus*): implications concerning divergence time of species. Immunogenetics. 41: 312-315.

Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H. 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: Review and future perspectives. In: Fisheries for Global Welfare and Environmental, Memorial book of the 5th Word Fisheries Congress. Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T.D., Kaiser, M.J. (eds.). 263-276, ISBN 978-4-88704-144-8, Terrapub, Setagaya-ku, Japan.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

Athanassopoulou, F., Billinis, C., Prapas,Th. 2004. Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. Diseases of Aquatic Organisms. 60: 247-252.

Austin, B., Brunt, J.W. 2009. The use of probiotics in aquaculture. In: Aquaculture Microbiology and Biotechnology. Volume 1. Montet, D., Ray, R.C. (eds.). Science Publishers, ISBN 978-1-57808-574-3, Enfield, New Hampshire, USA. pp. 185-207.

Badwy, T.M., Ibrahim, E.M., Zeinhom, M. 2008. Partial replacement of fish meal with dried microalgae (Chlorella spp and Scenedesmus spp) in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. pp. 801- 811.

Bai, S.C., Koo, J.W., Kim, K.W., Kim, S.K. 2001. Effects of *Chlorella* powder as a feed additive on growth performance in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquaculture Research. 32(1): 92-98.

Balfry, S.K., Higgs, D.A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of fish. In: Nutrition and Fish Health. Chorn, L., Webster, C.D. (eds.). The Haworth Press, Inc., ISBN 1-56022-887-3, Binghamton, New York, USA. pp. 213-234.

Breton, A.L., Grisez, L., Sweetman, J., Ollevier, F. 2003. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). Journal of Fish Diseases. 20(2): 145-151.

Cha, K.H., Koo, S.Y., Lee, D.U. 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 10521-10526.

Cherif, N., Thiery, R., Castric, J., Biacchesi, S., Bremont, M., Thabti, F., Limem, L., Hammami, S. 2008. Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. Veterinary Research Communications. 33(4): 345-353.

Chi, S.C., Lo, C.F., Lin, S.C. 2001. Characterization of grouper nervous necrosis virus. Journal of Fish Diseases. 24: 3-13.

Coad, B.W. 2000. Criteria for assessing the conservation status of taxa (as applied to Iranian freshwater fishes). Biologia. 55: 537-555.

Emadi, H. 1985. Caspian Sea Salmon is the largest type of brown trout in the world. Abzian Monthly Journal. 4: 2-6. (In Persian).

Fukuda, Y., Nguyen, H.D., Furuhashi, M., Nakai,T. 1996. Mass mortality of cultured seven band grouper associated with Viral Nervous Necrosis. Fish Pathology. 31(3): 165-170.

Furasawa, R., Okinaka, Y., Nakai, T. 2006. Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). General Virology. 87: 233-239.

Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I., Empis, J. 2006. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcuspluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. European Food Research and Technology. 222(3-4): 362-367.

Grotmol, S., Totland, G.K. 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Diseases of Aquatic Organisms. 39: 89-96.

Ghasemi, M., Zorriehzahra, M.J., Sharifpour, E., Haghighi karsidani, S. 1393. Journal of Aquaculture Development. 7(3): 53-61.

Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Stein (ed.) Handbook of Phycological Methods. Vol. 1. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 289-312.

Hegde, A., Teh, H.C., Lam, T.J. and Sin, Y.M., 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulate* –comparative characterization and pathogenicity studies. Archives of Virology. 148(3): pp. 575-586.

Husgarõ, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B.K., Rodseth, O.M., Biering, E. 2001. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot Scophthalmus maximus and Atlantic halibut Hippoglossus hippolgossus, and evaluation of a vaccine against SJNNV. Diseases Aquatic Organisms. 45: 33-44.

Ibrahem, M.D., Mohamed, M.F., Ibrahim, M.A. 2013. The role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in growth and immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection. Journal of Agricultural Science. 5(6): 109- 117.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

Katharios, P., Papadakis, I.E., Prapas, A., Dermon, C.R., Ampatzis, K., Divanach, P. 2005. Mortality control of VNN disease in grouper, *(Epinephelus marginatus)* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. European Aquaculture Society, Biotechnologies for Quality, Barcelona, Spain, 20-23 October 2004. pp. 455-456.

Kim, K.W., Bai, S.C., Koo, J.W., Wang, X., Kim, A.K. 2007. Effects of dietary *Chlorella ellipsoidea* supplementation on growth, blood characteristics, and whole-body composition in juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of world aquaculture society. 33(4): 425-431.

Kim, S., Rahimnejad, S., Kim, K.W., Lee, B.J., Lee, K.J. 2013a. Effects of dietary supplementation of Spirulina and Quercetin on growth, innate immune responses, disease resistance against *Edwardsiella tarda*, and dietary antioxidant capacity in the juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries and Aquatic Sciences. 16(1): 1-8.

Kim, S., Rahimnejad, S., Kim, K.W., Lee, K.J. 2013b. Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 13: 197-204.

Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T., Yoshimizu, M. 2008. A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septem fasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). Aquaculture. 284:41-45.

Kum, C., Sekkin, S. 2011. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs, recent advances in fish farms. Aral, F. (ed.). InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/th immune system drugs in fish immune function immunoassay drugs.

Lu, M., Chao, Y., Guo, T., Santi, N., Evensen, O., Kasani, S.K., Hong, J., Wu, J. 2008. The interferon response is involved in nervous necrosisvirus acute and persistent infection in zebrafish model. Molecular Immunology. 45: 1146-1152.

Maeno, Y., Delapena, L.D., Cruz-Lacierda, E.R. 2004. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared sea bass *Lates calcarifer* in the Philippines. Journal of Fish Diseases. 38(1): 69-73.

Maeno, Y., Delapena, L.D., Cruz-Lacierda, E.R. 2007. Susceptibility of fish species cultured in mangrove brackish area to Piscine Nodavirus. Japan Agricultural Research Quarterly. 41(1): 95-99.

Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Diseases of Aquatic Organisms. 18: 103-107.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology. 29: 2-14.

Office International Epizooties (OIE). 2010 & 2013. Viral encephalopathy and retinopathy. In: Manual of diagnostic tests for aquatic animal, office international des epizooties (OIE), Paris, France. pp. 169-175.

Rasooli, M. 2009. Clinical Biochemistry. Rozhin Mehr Publication. 396 p. (in Persian).

Roberts, R.J. 1978. The path physiology and systematic pathology of teleosts. In: Fish Pathology. Roberts, R.J. (ed). Bailliere Tindall, London, England. pp. 55-91.

Roongkamnertwongsa, S., Kanchanakhan, S., Danayadol, Y., Direkbusarakom, S. 2005. Identification of a betanodavirus isolated from viral nervous necrosis disease in red-spotted grouper (Epinephelus coioides) cultured in Thailand using PCR and sequence analysis. In: Walker, P., Lester, R., Bondad-Reantaso, M.G. (eds). Diseases in Asian Aquaculture. pp. 207-216.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., Vaca-Garsia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 35: 265-278.

Samuelsen, O.B., Nerland, A.H., Jorgensen, T., Schroder, M.B., Svasand, T., Bergh, O. 2006. Viral and bacterial diseases of Atlantic cod Gadus morhua, their prophylaxis and treatment: a review. Diseases of Aquatic Organisms. 71: 239-254.

Sattari, M. 2006. Fisheries (Anatomy and physiology). Haghshenas Publication. 662 p. (in Persian).

Saurabh, S., Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an importantdefence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. 39: 223-239.

Skliris, G.P., Krondiris, J.V., Sideris, D.C., Shinn, A.P., Starkey, W.G., Richards, R.H. 2001.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]

Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. Virus Research. 75: 59-67.

Tanaka, K., Konishi, F., Himeno, K., Taniguchi, K., Nomoto, K. 1984. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. Cancer Immunology, Immunotherapy. 17: 90-94.

Tanaka, Sh., Aoki, H., Nakai, T. 1998. Pathogenicity of the Nodavirus detected from diseased Sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Fish Pathology. 33(1): 31-36.

Mozanzadeh, M.T., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N. and Marammazi, J.G., 2015. Reference intervals for haematological and plasma biochemical parameters in sobaity sea bream juveniles (Sparidentex hasta, Valenciennes 1830). Comparative Clinical Pathology. 24(6): pp.1501-1507.

Thiery, R., Raymond, J.Ch., Castric, J. 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, Dicentrachus labrax: study by nested revers transcriptase-polymerase chain reaction. Virus Research. 63: 11-17.

Vendramin, N., Patarnello, P., Toffan, A., Panzarin, V., Cappellozza, E., Tedesco, P., Terlizzi, A., Terregino, C., Cattoli, G. 2013. Viral encephalopathy and retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy: a threat for wild endangered species? BMC Veterinary Research. 9(20):1-7.

Xu, W., Gao, Zh., Qi, Zh., Qiu, M., Peng, J., Shao, R. 2014. Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of Gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 14: 53-57.

Xylouri, E., Kotzamanis, Y.P., Athanassopoulou, F., Dong, L., Pappas, I.S., Argyrokastritis, A. Fragkiadaki, E. 2007. Isolation, characterization, and sequencing of Nodavirus in sturgeon *(Acipenser gueldestaedi* L.) reared in freshwater facilities. Aquaculture. 59(1): 36-41.

Yanuhar, U., Nurdiani, R., Hertika, A.M.S. 2011. Potency of *Nannochloropsis oculata* as antibacterial, antioxidant and antiviral on Humpback Grouper infected by *Vibrion alginolyticus* and viral nervous necrotic. Journal of Food Science and Engineering. 1: 323-330.

Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, S.J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaatari, S.L., Rowley, A.F. (eds.). Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, Fair Haven, NJ. 131-141.

Yu, C.M. 2006. Effects of pathogen on blood and serum chemistry of grouper. M.Sc. Thesis, Marine Biology Department, National Sun Yat-sen University, Taiwan.

Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, ACMAR, Kato, T., Sakai, M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina* platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture. 258: 157-163.

Zorriehzahra, M.J. 2004. Special report on the occurrence of the first case of viral nervous necrosis disease in Goldfish in the Caspian Sea. Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI). 45 p.

Zorriehzahra, M.EJ., Nakai, T., Gomez, D., Chi, C.S., Sharifpour, I., Hassan, H.M.D., Saeidi, A.A. 2005. Mortality of wild golden grey mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea associated with viral nervous necrosis-Like agent. Iranian Journal of Fisheries Science. 4(2):43-58.

Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Haghighi Karsidani, S., Nazari, A. 2012. Study on viral nervous necrosis (isolation, characterisation and pathogenesis) in Golden grey mullet in the Caspian Sea and study of pathogenecity and possibility of transmission to the other fish species (Sturgeon fishes, *Rutilus kutum*, Rainbow trout and Carp). Research Final Report. IFRO. 186 p. (in Persian).

Zorriehzahra, M.E.J., Ghiasi, M., Binaei, M. 2013. Investigation of blood and serum indices of Golden grey mullet (*Liza auratus*) in Caspian Sea waters of Mazandaran province following a new emerging disease. Aquaculture Development (Biological Sciences) Journal. 7(4): 25-33.

Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, M., Mehrabi, M.R., Kakoolaki, Sh., Radkhah, K., Nazari, A., Rohani, M.S., Haghighi Karsidani, S. 2013. The investigation on histopathological changes of four ornamental fish species due to expose of causative virus of viral nervous necrosis (VNN) disease. 16th international conference on diseases of fish and shellfish. 2-6 September 2013, At Tampere, Finland.

Zorriehzahra, M.E.J., Ghasemi, M., Ghiasi, M., Karsidani, S.H., Bovo, G., Nazari, A., Dhama, K. (2016). Isolation and confirmation of viral nervous necrosis (VNN) disease in golden grey mullet (*Liza aurata*) and leaping mullet (*Liza saliens*) in the Iranian waters of the Caspian Sea. Veterinary Microbiology. 190: 27-37.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-07-03]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.7.2]