



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان دامپزشکی کشور

برنامه بررسی و مراقبت بیماری های اولویت دار ماهیان دریایی و پرورش ماهی در قفس

معاونت بهداشتی و پیشگیری
دفتر بهداشت و مدیریت بیماریهای آبزیان
آبان ۱۳۹۸

۱. مقدمه:

در راستای اجرای بند الف و ب ماده ۳ و ماده ۵ قانون سازمان دامپزشکی کشور و آیین نامه مبارزه با بیماری های دامی و جلوگیری از سرایت و انتشار آنها، به منظور بررسی سلامت مولدین و ماهیان دریایی در برابر بیماریهای خطرناک لیست شده سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) طرح مراقبت از بیماریهای اولویت دار ماهیان دریایی کشور در سطح مراکز تکثیر، تکثیر و پرورش و پرورش کشور تهیه و در آبان ماه ۱۳۹۸ به روزرسانی شده است.

۲. تعاریف:

۲,۱. بررسی بیماری (Survey): جمع آوری اطلاعات در خصوص وضعیت یک بیماری و عوامل موثر در رخداد آن با هدف ارایه فرضیه مشخص و یا پاسخ به یک سوال پژوهشی خاص جهت دستیابی به یافته علمی و اکتشافی می باشد.

۲,۲. مراقبت (Surveillance): بررسی مداوم و سیستماتیک که بر روی یک جمعیت آبی هدف به منظور ردیابی وقوع بیماری با اهداف کنترلی که ممکن است نیازمند نمونه برداریهایی برای آزمایش کردن نیز باشد.

۲,۳. مراقبت فعال (Active): بر اساس روش جمع آوری داده ها، مراقبت فعال به جمع آوری داده هایی مربوط می شود که بر اساس نمونه برداری جمعی با اهداف تعریف شده مشخص حمایت می شود. مراقبت فعال بررسی شیوع بیماری و مراقبت مخاطره محور و دیده وری را در بر می گیرد.

۲,۴. مراقبت غیر فعال (Passive): جمع آوری منفعل داده ها شامل گزارش موارد بالینی یا تحت بالینی مشکوک و گزارشات آزمایشگاهی توسط متخصصین، کلینیسین ها، پرورش دهندگان و سایر افراد به صلاح دید خودشان به مسئولین بهداشت و سلامت است.

۲,۵. امنیت زیستی (Biosecurity): مجموعه اقدامات پیشگیرانه ای است که به منظور حفاظت از موجودات زنده در برابر مخاطرات (بیماری ها و حوادث) و جهت جلوگیری از ورود عامل بیماریزا به جمعیت هدف و جلوگیری از گسترش بیماری از استخرهای مزارع آلوده به استخرها و مزارع همجوار انجام می شود و به عبارتی شیوه ای پیشگیرانه است که نقش موثری در تأمین سلامتی آبزیان زنده ایفا میکند.

۳. اهداف :

۳,۱. تعیین وضعیت بیماریهای مهم ویروسی (بوژه)، باکتریایی و انگلی در مزارع تکثیر و پرورش دریایی و شناسایی کانون های اندمیک بیماری و پیش بینی وضعیت آینده بیماری

۳,۲. تشخیص به موقع عوامل بیماریزا به منظور پیشگیری از رخداد و شیوع گسترده بیماری در مراکز تکثیر و پرورش دریایی

۳,۳. شناسایی مولدین حامل بیماری و حذف آنها از چرخه تولید و تکثیر و جایگزینی آنها با گونه‌های سالم و غیر حامل عامل پاتوژن با همکاری ارگانهای ذیربط

۴. مراحل اجرا:

این طرح شامل دو بخش اصلی می باشد:

- سیستم مراقبت فعال (Active Surveillance): در این بخش بازدیدهای لازم به منظور بررسی

بالینی و یا بررسی بالینی همراه با ارجاع نمونه به آزمایشگاه جهت بیماریهای مورد نظر انجام می شود.

- سیستم مراقبت غیرفعال (Passive Surveillance): سیستم مراقبت غیرفعال مبتنی بر دریافت

گزارش بروز علائم بالینی، رخداد تلفات و یا جداسازی عوامل بیماریزا به منظور کنترل هدفمند بیماری های بومی (اندمیک) در کشور به اجرا در می آید.

۴,۱. برنامه مراقبت فعال از مراکز تکثیر ماهیان دریایی

الف) بیماریهای ویروسی

در این برنامه هفت بیماری ویروسی تحت کنترل خواهد بود.

۴,۱,۱. بیماری رتینوپاتی و آنسفالوپاتی ویروسی یا نکروز عصبی ویروسی (VER (Viral Encephalopathy and Retinopathy) / VNN (Viral Nervous Necrosis)

این بیماری بعنوان یک بیماری ویروسی جدی در چندین گونه از ماهیان دریایی پرورشی مطرح است که با تلفات شدید و ضایعات واکوئله در سیستم عصبی مرکزی و شبکه همراه است. بیماری در بیش از ۱۶ خانواده و ۵۰ گونه مختلف ماهی گزارش شده است.

بیماری عمدتاً در مراحل لاروی و ماهیان جوان رخ می دهد ولی تلفات شدیدی در ماهیان سائز بازاری و بالغ سی باس اروپایی، هامور هفت خط و هالیبوت اطلس نیز گزارش شده است.

عامل بیماری: عامل بیماری در جنس بتانودا ویروس و خانواده نوداویریده قرار گرفته است. بتانودا ویروس ها غیر پوشش دار، RNA دار دو رشته ای است و دارای ۴ ژنوتیپ عمده و سه سروتیپ می باشد.

جدول شماره ۱: انواع فنوتیپ و ژنوتیپ بتانوداویروس

Genotype	Serotype	Target host fish	Optimum growth temperature
SJNNV	A	Stripped jack	20–25°C
TPNNV	B	Tiger puffer	20°C
BFNNV	C	Cold-water fish: Atlantic halibut, Atlantic cod, flounders, etc.	15–20°C
RGNNV	C	Warm-water fish: Asian sea bass, European sea bass, groupers, etc.	25–30°C

علائم بالینی:

به جز مواردی از تغییر رنگ بدن که توسط برخی از محققین گزارش شده، علائم خارجی بالینی خاصی بر روی بدن یا آبشش ماهیان مبتلا مشاهده نمی شود. گاهی در ماهیان سی باس اروپایی، زخم های جلدی بر روی فک پایین و یا سر ماهی که عمدتاً در اثر اختلال در بینایی ماهی است دیده می شود. تغییرات رفتاری: ماهیان بیمار علائم شنای نامنظم از قبیل چرخش، شنای مارپیچ، شنا بر روی پشت در حالت استراحت (در اثر اتساع کیسه شنا)، قرار گرفتن در کف مخزن یا استخر، شنای سریع دایره وار یا مستقیم را از خود نشان می دهند. در ماهیان پهن معمولاً علائم خاصی از بیماری مشاهده نمی شود و ماهیان مبتلا ممکن است در کف استخر و بصورت خمیده دیده می شود. در اکثر موارد عدم اشتها مشاهده شده است.

علائم کالبدگشایی:

به جز اتساع شدید کیسه شنا که گاهی اوقات در برخی از گونه ها مشاهده می شود، جراحات قابل رویت خاصی در این بیماری قابل مشاهده نیست.

تعریف مورد مشکوک به بیماری

مطابق با دستورالعمل OIE مورد مشکوک به بیماری VNN با مشاهده حداقل یکی از موارد ذیل تعریف می شود:

۱. مشاهده شنای غیرطبیعی در گونه های حساس ماهیان
۲. مشاهده ضایعات هیستوپاتولوژی در گونه های حساس ماهیان
۳. مشاهده ضایعات سلولی در کشت ویروس قبل از تأیید
۴. دریافت نتیجه آزمایش مثبت از یک مورد بر اساس تستهای سطوح تشخیصی b و a در جدول OIE در تشخیص اولیه شامل: هیستوپاتولوژی، هیستوپاتولوژی و متعاقباً Immunostaining، آزمایش مولکولی Real time PCR، RT PCR و سکانس ژنی، جداسازی در کشت و متعاقباً تأیید با PCR یا Immunostaining
۵. انتقال ماهی زنده از مزرعه آلوده به مزرعه دیگر
۶. وجود ارتباطات اپیدمیولوژیکی مختلف بین یک مزرعه آلوده و یک مزرعه دوم
۷. تشخیص آنتی بادی فعال

تعریف مورد قطعی و تأیید شده بیماری

۱. یک مورد مشکوک که ضایعه تخریب سلولی CPE ایجاد کند و سپس عامل بیماری با یکی از روشهای ایمونولوژیکی و یا مولکولی تشخیص داده شود.
۲. دریافت نتیجه مثبت دوم از یکی از روشهای سطح تشخیصی a شامل جداسازی در کشت و متعاقباً تأیید با PCR، آزمایش مولکولی Real time PCR، RT PCR و متعاقباً سکانس ژنی، RT PCR

جمعیت هدف نمونه برداری:

گونه های هدف: ماهیان خاویاری، ماهیان دریایی جنوب (هامور، شانک، صبیتی، ...) و گونه های وارداتی به منظور پرورش در قفس در آبهای ساحلی جنوب (سی باس آسیایی، سی باس اروپایی، سی بریم) و ماهی سوف

زمان نمونه برداری: زمانی که بچه ماهی ها به وزن بالاتر از ۱ گرم رسیده باشند.

نمونه برداری:

نمونه برداری جهت آزمایش ویروسی به روش مولکولی

در صورتی که در جمعیت مورد نمونه برداری ماهیان بی حال، درحال مرگ و یا دارای شنای غیرطبیعی وجود دارد، نمونه های لازم از آنها اخذ می گردد. در لاروها و بچه ماهیان با طول کمتر از یک سانتی متر کل ماهی به آزمایشگاه ارسال می شود و در ماهیان بین ۱-۶ سانتی متر کل سر (شامل مغز و چشم) جدا و ارسال می شود و در ماهیان بزرگتر از مغز، چشم و طناب عصبی نمونه برداری و در محلول نگهدارنده (الکل ۸۰ تا ۱۰۰ درجه) به آزمایشگاه ارسال می شود. نمونه های اخذ شده از **حداکثر ۵ قطعه ماهی** در یک ظرف مخلوط و ارسال می شود. نمونه ها در مجاورت یخ و با حفظ زنجیره سرد ارسال گردد.

نمونه برداری جهت آزمایش پاتولوژی:

برای بررسی بیماری به روش پاتولوژی از تعداد ده قطعه ماهی (ترجیحاً ماهی بالاتر از وزن یک گرم) و ماهیان بی حال نمونه برداری و در محلول فرمالین ۱۰٪ با حجم ده برابر نمونه بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی مرکز تشخیص سازمان ارسال گردد.

جدول شماره ۲: تعداد بازدید و نمونه برداری جهت مراقبت از بیماری VNN در مراکز تکثیر

نوع مزرعه	تعداد بازدید در سال	تعداد نمونه برداری در سال	نمونه برداری	
			نوع نمونه	لارو یا بچه ماهی
روش آزمایش				

بچه ماهی: Nested-pcr	ماهی کامل، سر و یا مغز، چشم، نخاع (بسته به سائز ماهی)	۱۵۰ قطعه در ماهیان وارداتی و ۷۵ قطعه تکثیر داخل	۱	۱	مزارع تکثیر دارای ماهی مولد و بچه ماهی و مراکز واردکننده بچه ماهی دریایی
پاتولوژی	ماهی کامل	۱۰	۱	۱	

۴,۱,۲. بیماری ایریدو ویروس ماهی سی بریم قرمز:

عامل بیماری ایریدو ویروس شانک قرمز یا Red sea bream iridovirus است که موجب تلفات در ماهی سی بریم قرمز و بیش از ۳۰ گونه ماهیان دریایی پرورشی می باشد که این ماهیان عمدتاً متعلق به راسته سوف ماهی شکلان و پهن ماهی شکلان می باشند.

تشخیص بالینی:

ماهیان بیمار دارای علائم بی حالی، آنمی شدید، پتشی در آبشش ها و بزرگ شدن طحال می باشند و دارای شنای غیرفعال بوده و کم خونی، افزایش تعداد و اختلال تنفسی مشهود است.

علائم کالبدگشایی:

رنگ پریدگی آبشش ها و بزرگ شدن طحال

تعریف مورد مشکوک:

مطابق با دستورالعمل OIE مورد مشکوک به بیماری RSIVD با مشاهده حداقل یکی از موارد ذیل تعریف می شود:

۱. حضور علائم بالینی مشخص و تأیید سلولهای غیرطبیعی بزرگ شده در مقاطع بافتی و یا Stamp smear
۲. حضور علائم بالینی مشخص و تأیید حضور ویرون بوسیله میکروسکوپ الکترونی
۳. جداسازی ویروس در محیط کشت و مشاهده CPE
۴. مثبت بودن نتیجه IFAT بر روی لام

تعریف مورد قطعی:

مطابق با دستورالعمل OIE بیماری RSIVD در صورتی تأیید می شود که علاوه بر موارد قبلی یک و بیش از یکی از موارد ذیل مشاهده شود.

۱. جداسازی ویروس در محیط کشت و مشاهده CPE خاص و نتیجه مثبت IFAT با استفاده از محیط کشت آلوده

۲. جداسازی ویروس در محیط کشت و مشاهده CPE خاص و نتیجه مثبت PCR بر روی DNA استخراج شده از ویروس جدا شده

۳. مثبت بودن نتیجه PCR بر روی DNA استخراج شده از اندام های درگیر

۴. مشاهده سلولهای غیرطبیعی بزرگ در IFAT

جمعیت هدف نمونه برداری:

گونه های هدف: ماهیان دریایی جنوب (هامور، شانک، صبیتی، ...) و گونه های وارداتی به منظور پرورش در قفس در آبهای ساحلی جنوب (سی باس آسیایی، سی باس اروپایی، سی بریم) و ماهی سوف

نمونه برداری:

نمونه برداری جهت آزمایش مولکولی:

در صورتی که در جمعیت مورد نمونه برداری ماهیان بی حال، درحال مرگ و یا دارای شنای غیرطبیعی وجود دارد، نمونه های لازم از آنها اخذ می گردد. در لاروها و بچه ماهیان با طول کمتر از ۴ سانتی متر کل ماهی به آزمایشگاه ارسال می شود و در ماهیان بزرگتر از طحال، کلیه، قلب، نمونه برداری و در محلول نگهدارنده (الکل ۸۰ تا ۱۰۰ درجه) به آزمایشگاه ارسال می شود.

نمونه های اخذ شده از حداکثر ۵ قطعه ماهی در یک ظرف مخلوط و در مجاورت یخ و با حفظ زنجیره سرد ارسال می شود.

جدول شماره ۳: تعداد بازدید و نمونه برداری جهت مراقبت از بیماری RSIVD در مراکز تکثیر

روش آزمایش	نمونه برداری		تعداد بازدید در سال	تعداد نمونه برداری در سال	نوع مزرعه
	تعداد نمونه	نوع نمونه			
بچه ماهی: RT-qPCR	۱۵۰ قطعه در ماهیان وارداتی و ۷۵ قطعه تکثیر داخل	طحال، کلیه، قلب، آبشش، روده	۱	۱	مزارع تکثیر دارای ماهی مولد و بچه ماهی و مراکز واردکننده بچه ماهی دریایی
پاتولوژی	۱۰	بچه ماهی کامل	۱	۱	

نمونه برداری جهت آزمایش پاتولوژی:

برای بررسی بیماری به روش پاتولوژی از تعداد ده قطعه ماهی (ترجیحاً ماهی بالاتر از وزن یک گرم) و ماهیان بی حال نمونه برداری و در محلول فرمالین ۱۰٪ با حجم ده برابر نمونه بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی مرکز تشخیص سازمان ارسال گردد

۴,۱,۳. بیماری هرپس ویروس کوی Koi Herpesvirus disease

بیماری هرپس ویروس کوی یک بیماری هرپس ویروسی است که قادر به ایجاد ویرمی واگیر و حاد در کپور معمولی و گونه های مربوط به آن مانند کوی و هیبرید حاصل از گلدفیش و کپور معمولی می باشد. عامل بیماری، هرپس ویروس کوی از خانواده آلو هرپس ویریده می باشد.

علائم بالینی:

در زمان رخداد بیماری KHV میزان تلفات به طور قابل توجهی افزایش می یابد. ماهیان در کلیه سنین حساس به بیماری می باشند اما در شرایط تجربی ماهیان جوان تا یک سال حساسیت بیشتری دارند (ماهیان ۲/۵ تا ۶ گرم در مقایسه با ۲۳۰ گرم حساسترند).

در معاینه از راه نزدیک ماهیان، علائم بارز بیماری مانند رنگ پریدگی و یا قرمز شدن پوست که ممکن است با سخت شدن پوست (سمباده ای شدن پوست) همراه باشد. کنده شدن موضعی یا کامل اپیدرم، افزایش یا کاهش تولید موکوس (در نواحی سمباده ای شده) بر روی پوست و آبشش و رنگ پریدگی آبشش ها مشاهده می شود. سایر علائم بالینی شامل فرورفتگی چشم ها و خونریزی روی پوست و قاعده باله ها و زخم های روی پوست است. ماهیان مبتلا لاغر شده و از گله جدا و در کناره های استخر یا ورودی آب تجمع و از سطح آب تنفس می کنند. در برخی از ماهیان ممکن است از دست دادن تعادل و تشخیص جهت یابی مشاهده می شود اما ممکن است افزایش فعالیت هم مشاهده شود.

علائم کالبدگشایی:

جراحات کالبدگشایی اختصاصی برای بیماری وجود ندارد. تشخیص نهایی باید از طریق جداسازی ویروس و تشخیص آن و یا ردیابی DNA ویروس به روش مولکولی صورت گیرد. به هر حال مهمترین علامت کالبدگشایی قابل مشاهده در آبشش ها بصورت نواحی نکروز کمرنگ تا تغییر رنگ وسیع، نکروز شدید و التهاب آبشش ها قابل مشاهده است. علامت قابل مشاهده بعدی حضور نواحی کمرنگ و غیرمنظم بر روی پوست به همراه افزایش ترشح موکوس بر روی پوست و نیز کاهش ترشح موکوس و خشکی قسمتهایی از پوست است که دچار سختی و حالت سمباده ای شده اند.

تعریف مورد مشکوک به بیماری:

مطابق با دستورالعمل OIE مورد مشکوک به بیماری KHVD با مشاهده حداقل یکی از موارد ذیل تعریف می شود:

تعریف مورد مشکوک به بیماری KHV:

مشاهده هر یک از موارد ذیل به عنوان مورد مشکوک در نظر گرفته می شود.

۱. مشاهده علائم بالینی مشخص بیماری در جمعیت ماهیان گونه های حساس
۲. مشاهده علائم هیستوپاتولوژی مشخص در مقاطع بافتی
۳. مشاهده ضایعات سیتوپاتیک مشخص در محیط کشت حساس بدون تشخیص عامل مسبب
۴. حصول نتیجه مثبت از یکی از روش های تشخیصی سطوح a و b جدول تشخیصی OIE
۵. جابجایی ماهی زنده از محلی که وجود بیماری KHV در آنجا تأیید شده است و یا دارای علائم بالینی مشکوک است به محلی که فاقد علائم مشکوک به بیماری می باشد.
۶. وجود سایر زنجیره های اپیدمیولوژی یا مزارعی که بیماری KHV در آن وجود دارد.
۷. ردیابی آنتی بادی ضد KHV

تعریف مورد قطعی بیماری:

معیارهای ذیل بایستی جهت تأیید مورد قطعی بیماری لحاظ شوند.

۱. مرگ و میر، علائم بالینی و تغییرات پاتولوژی مرتبط با بیماری KHV و شناسایی ویروس با یکی از روش های ذیل:

۱,۱. شناسایی ویروس با روش PCR

۱,۲. شناسایی ویروس در آماده سازی بافت با روش های آنتی بادی اختصاصی بر علیه ویروس (به عنوان مثال

(IFA

۱,۳. جداسازی ویروس در کشت سلول (حداقل از یک قطعه ماهی)

۲. در زمان عدم وجود علائم بالینی و تلفات با یک یا هر روش ذیل:

۲,۱. شناسایی و تأیید بیماری با روش PCR (مطابق با روش ارایه شده در OIE)

۲,۲. حصول نتیجه مثبت از دو روش مختلف تشخیصی سطوح a و b جدول تشخیصی OIE

جمعیت هدف نمونه برداری:

گونه های ماهیان گرمابی مراکز بازسازی ذخایر شمال (سفید، کلمه، کپور دریایی.....)

نمونه برداری:

با توجه به عدم ردیابی و بروس عامل بیماری در برنامه پایش و مراقبت صورت گرفته در کشور، در سال آتی مراقبت بر پایه علائم بالینی مدل "Clinical Base" انجام می گردد، این برنامه بر اساس بازرسی، معاینه و مشاهده علائم بالینی و ارزیابی بهداشتی مراکز انجام می شود و در صورتی که علائم منتسب به بیماری و یا حالت های مشکوک به بیماری وجود داشته باشد، اقدام به نمونه برداری و ارسال به آزمایشگاه مربوطه گردد.

جدول شماره ۴: تعداد بازدید و نمونه برداری جهت مراقبت از بیماری KHV در مراکز تکثیر

روش آزمایش	نمونه برداری		تعداد نمونه برداری در سال	تعداد بازدید در سال	نوع مزرعه
	نوع نمونه	ماهی			
RT- qPCR	طحال، کلیه، آبشش	نمونه برداری مرضی (۱۰ عدد)	در صورت مشاهده مورد مشکوک بیماری	۱	مزارع تکثیر

نکته: بازدید زمانی صورت می گیرد که دمای آب به بالاتر از ۱۷ درجه سانتی گراد رسیده باشد و سه هفته از رسیدن به این دما گذشته باشد.

۴,۱,۴. بیماری ویرمی بهاره کپورماهیان Spring viremia of carp

ویرمی بهاره کپورماهیان یک بیماری رابدو ویروسی است که ایجاد خونریزی حاد و ویرمی واگیردار در گونه های مختلف کپور و برخی دیگر از خانواده کپورماهیان و گونه های گربه ماهی می کند. عامل بیماری و بروس ویرمی بهاره کپورماهیان، جنس وریکولوویروس از خانواده رابدوویریده می باشد.

علائم بالینی:

در زمان رخداد بیماری افزایش قابل ملاحظه تلفات رخ می دهد. رنگ بدن ماهیان مبتلا معمولاً تیره تر می شود. علائم بالینی تیپیک شامل اگزوفتالمی، بی رنگی آبشش، خونریزی در پوست و قاعده باله ها و مخرج، اتساع محوطه بطنی یا آب آوردگی (آسیت) و بیرون زدگی مخرج می باشد. کلیه این علائم در یک ماهی یا جمعیت ممکن است بصورت همزمان دیده نشود. برخی از این علائم ممکن است در سایر بیماری ها نیز دیده شود. بطور کلی ماهیان جوان تا یک سال حساسیت

بیشتری نسبت به بیماری دارند ولی کلیه سنین می توانند به بیماری مبتلا شوند. ماهیان بیمار لاغر، از گله جدا و در ورودی یا کناره های استخر تجمع یافته و در مواردی عدم تعادل در شنا دیده می شود.

علائم کالبدگشایی:

جراحات کالبدگشایی اختصاصی برای بیماری وجود ندارد. علائم کالبدگشایی عمدتاً برای کپور معمولی مشخص شده و ممکن است شامل افزایش مایعات محوطه بطنی که معمولاً خونی است، دژنرانس لاملای آبشش، التهاب روده که به جای غذا موکوس در روده دیده می شود. ادم و خونریزی اعضای داخلی بدن مشاهده می شود. خونریزی های کانونی در عضلات، بافت چربی و کیسه شنا ممکن است دیده شود.

تعریف مورد مشکوک:

بیماری SVC زمانی که تلفات سریع و قابل توجهی در جمعیت ماهیان گونه های حساس به بیماری بویژه زمانی که علائم بالینی مرتبط با SVC را نشان دهد، باید مورد توجه قرار داد. همچنین زمانی که علائم هیستوپاتولوژی در مقاطع بافتی و یا CPE در کشت سلول بدون تشخیص عامل مسبب و یا زمانی که یک نتیجه مثبت از یکی از روشهای تشخیصی اخذ شده باشد.

تعریف مورد قطعی بیماری:

در صورت وقوع بیماری برای اولین بار در یک کشور و یا منطقه و یا در مناطقی که قبلاً سابقه بیماری داشته اما در دو سال گذشته در برنامه مراقبت بیماری ردیابی نشده رخ دهد اولین مورد ردیابی شده به عنوان Index case در نظر گرفته می شود و تشخیص قطعی بیماری ضروری است. در صورت مشاهده CPE در کشت سلول و تأیید تشخیص ویروس با استفاده از آزمایشات سرمی یا RT-PCR به همراه سکانس ژنی و همچنین در صورت مثبت بودن دو روش تشخیصی تأیید بیماری قطعی است. در صورت استفاده از آزمایشات سرمی بایستی آنتی سرم مصرفی اختصاصی باشد و همچنین در آزمایش RT-PCR انجام سکانس ژنی جهت تشخیص قطعی الزامی است. در غیر این صورت به عنوان مشکوک تلقی می شود.

جمعیت هدف نمونه برداری:

مراکز ماهیان گرمابی بازسازی ذخایر شمال (سفید، کلمه، کپور دریایی.....)

نمونه برداری:

با توجه به عدم ردیابی ویروس عامل بیماری در برنامه پایش و مراقبت صورت گرفته در کشور، در سال آتی مراقبت بر پایه علائم بالینی مدل " Clinical Base " انجام می گردد، این برنامه بر اساس بازرسی، معاینه و مشاهده علائم بالینی و ارزیابی بهداشتی مراکز انجام می شود و در صورتی که علائم منتسب به بیماری و یا حالت های مشکوک به بیماری وجود داشته باشد، اقدام به نمونه برداری و ارسال به آزمایشگاه مربوطه گردد.

جدول شماره ۵: تعداد بازدید و نمونه برداری جهت مراقبت از بیماری SVC در مراکز تکثیر

روش آزمایش	نمونه برداری		تعداد نمونه	تعداد	نوع مزرعه
	نوع نمونه	ماهی	برداري در سال	بازديد در سال	
RT- qpcr	طحال، کلیه، آبشش، مغز	نمونه برداری مرضی (۱۰ عدد)	در صورت مشاهده مورد مشکوک بیماری	۱	مزارع تکثیر

نکته: بازدید زمانی صورت می گیرد که دمای آب در محدوده ۱۱ تا ۱۷ درجه سانتی گراد باشد.

۴،۱،۵. بیماری نکروز عفونی بافت خونساز (IHN):

بیماری ویروسی است که اکثر گونه های خانواده آزادماهیان آب شیرین و دریا را درگیر می کند اما بیشتر در قزل آلائی رنگین کمان موجب بیماری و تلفات می شود. عامل بیماری رابدوویروس است و در مقابل حرارت، اسید و اتر ناپایدار است و در آب شیرین در دماهای پایین و حاوی مواد آلی تا یک ماه زنده می ماند.

تشخیص بالینی:

علائم بالینی: ماهیان درگیر با علائم رفتاری و شنای غیرطبیعی، ملانوز، اگزوفتالمی، آبشش های کمرنگ، آسیت و تورم شکمی و خونریزی های پتشی خارجی و داخلی مشاهده می شوند.

علائم رفتاری غیرطبیعی شامل بی حالی و شنای غیرطبیعی مانند شنای ماریچی، چرخشی و فلشینگ (چرخیدن به پهلو) می باشد. کست های آویزان مدفوعی در بعضی گونه ها مشاهده می شود. تغییر شکل ستون فقرات در بعضی از ماهیانی که از بیماری زنده مانده اند، دیده می شود.

علائم کالبدگشایی:

تیره شدن پوست (ملانوز)، آبشش های کمرنگ، آسیت، اگزوفتالمی، خونریزی های خارجی و داخلی، ارگان های داخلی کمرنگ و روده ها خالی و فاقد غذاست و مایع آسیتی در محوطه بطنی دیده می شود. کبد، طحال و کلیه کم خون است.

تعریف مورد مشکوک به بیماری IHN

مطابق با دستورالعمل OIE مورد مشکوک به بیماری IHN با مشاهده موارد ذیل تعریف می شود.

۱. مشاهده علائم بالینی بیماری در یک جمعیت حساس به بیماری

۲. مشاهده علائم کالبدگشایی مشخص در گونه های حساس به بیماری

۳. دریافت نتیجه آزمایش مثبت از یک مورد بر اساس تستهای سطوح تشخیصی b در جدول OIE شامل: هیستوپاتولوژی، میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی، تست های تشخیص سرمی و کالبدگشایی

تعریف مورد قطعی IHN:

تشخیص قطعی بیماری در مواردی است که یک مورد مشکوک به یکی از روشهای ذیل تأیید گردد:

۱- در کشت سلول دارای CPE بوده و به دنبال آن به روش مولکولی و یا سرمی تأیید شود.

۲- دریافت نتیجه مثبت دوم از یکی از روشهای بر پایه آنتی بادی، سکانس ژنی و یا PCR

جدول شماره ۶: تعداد بازدید و نمونه برداری جهت مراقبت از بیماری IHN در مراکز تکثیر

نوع مزرعه	تعداد بازدید در سال	تعداد نمونه برداری در سال	بازدید اول			بازدید دوم			روش آزمایش
			مولد	نوع نمونه	تعداد	لارو یا بچه ماهی	نوع نمونه	تعداد نمونه	
مزارع تکثیر دارای ماهی مولد و بچه ماهی	۲	۲	۳۰+۳۰	مایع تخمدانی و اسپرم	بر اساس جدول	*	طحال، کلیه، قلب	۳۰	مولد: کشت بچه ماهی: RT- qpcr

جمعیت هدف نمونه برداری:

آزادماهی

نمونه برداری جهت آزمایش مولکولی:

در صورتی که در جمعیت مورد نمونه برداری ماهیان بی حال، درحال مرگ و یا دارای شنای غیرطبیعی وجود دارد و یا ماهیانی که در خروجی آب شنا می کنند، نمونه های لازم از آنها اخذ می گردد. در لاروها و بچه ماهیان با طول کمتر از چهار سانتی متر کل ماهی به آزمایشگاه ارسال می شود و در ماهیان بزرگتر از طحال، قسمت قدامی کلیه، قلب نمونه برداری و در محلول نگهدارنده (الکل ۸۰ تا ۱۰۰ درجه) به آزمایشگاه ارسال می شود. نمونه های اخذ شده از حداکثر ۱۰ قطعه ماهی در یک ظرف مخلوط و ارسال می شود.

نمونه برداری جهت آزمایش کشت ویروسی (از مولدین):

نمونه برداری از مولدین با هماهنگی با پرورش دهنده و در زمان تخمگیری انجام شود. انتخاب مولدین به صورت تصادفی انجام می شود، تعداد مولدین مورد نمونه برداری ۳۰ مولد ماده می باشد. نمونه حاوی تخم و مایع تخمدانی جدا شده از ۱۰ مولد در یک ظرف استریل ریخته و کاملاً با هم مخلوط شود و از این نمونه مخلوط ۵ سی سی مایع تخمدانی اخذ شود و در محیط انتقالی VTM و با حفظ زنجیره سرد حداکثر طی مدت ۴۸ ساعت به آزمایشگاه (در مجاورت یخ و با حفظ زنجیره سرد) به آزمایشگاه مرکز ملی تشخیص بیماریهای سازمان دامپزشکی کشور ارسال گردد. در کل از هر مزرعه در نهایت ۳ لوله حاوی مایع تخمدانی تهیه می شود.

بیماری سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (VHS):

بیماری توسط ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی که متعلق به جنس نوی رابدوویروس و خانواده رابدوویریده می باشد، ایجاد می شود و به نوعی بیماری اول صنعت پرورش ماهی قزل آلا در دنیا می باشد. بیماری در تمام سنین دیده می شود ولی سنین ۳/ - ۳ گرم بسیار حساس تر هستند.

تشخیص بالینی:

بیماری اغلب با شروع ناگهانی تلفات، بی حالی، شنای غیرطبیعی، ملانوز، اگزوفتالمی، کم خونی، خونریزی در قاعده باله ها، آبشش، پوست و چشم و اتساع شکم ناشی از ادم در حفره شکمی رخ می دهد.

تغییرات رفتاری:

فرم عصبی بیماری با رفتار شنای غیرطبیعی کاملاً مشهود به صورت شنای مارپیچی و فلشینگ پیوسته مشاهده می شود. این حالت به دلیل تمایل ویروس به استقرار در سیستم عصبی می باشد. برخلاف سپتی سمی های باکتریایی در بیماری VHS ماهیان درگیر تمایلی به فرار کردن در زمان صید ندارند.

علائم کالبدگشایی:

علائم کالبدگشایی شامل خونریزی در پوست و عضلات بویژه عضلات پشتی و ارگان های داخلی می باشد. در فرم حاد بیماری، کلیه قرمز تیره میشود اما در ماهیان در حال مرگ نکروز شدید مشاهده می شود. طحال متورم و کبد کمرنگ و خالدار است. دستگاه گوارش بویژه در بخش انتهایی کمرنگ و خالی از غذاست.

تعریف مورد مشکوک به بیماری VHS:

مطابق با دستورالعمل OIE حضور ویروس عامل بیماری VHS در صورت مواجه با یکی از موارد ذیل محتمل است:

- ۱- وجود علائم کالبدگشایی مربوط به بیماری، همراه یا بدون علائم بالینی
- ۲- مشاهده ضایعات سلولی در کشت ویروس قبل از تأیید
- ۳- زمانی که در یک بررسی، ارتباطات اپیدمیولوژی با مزارع مشکوک یا تأیید شده بیماری مشخص شود (ردیابی آنتی بادی در ماهی)

تعریف مورد قطعی به بیماری VHS

تشخیص بیماری VHS در صورتی قطعی است که علاوه بر موارد فوق (موارد مشکوک به بیماری) یک و یا بیش از یک مورد از موارد ذیل نیز مشاهده شود.

- ۱- جداسازی ویروس در کشت سلول که متعاقباً به یک روش سرمی مانند ELISA، IFAT، خنثی سازی و یا ایمونوهیستوشیمی تأیید شود، روش مولکولی که متعاقباً با سکانس ژنی تأیید شود و یا Real time RT-PCR

- ۲- تشخیص ویروس در بافت به روش ایمونواسی با استفاده از آنتی های اختصاصی ضد ویروس VHS
- ۳- تشخیص ویروس در بافت به روش مولکولی RT-PCR و متعاقب آن سکانس ژنی و یا به روش real time PCR

جمعیت هدف نمونه برداری:

آزادماهی

نمونه برداری:

نمونه برداری جهت آزمایش مولکولی:

در صورتی که در جمعیت مورد نمونه برداری ماهیان بی حال، درحال مرگ و یا دارای شنای غیرطبیعی وجود دارد و یا ماهیانی که در خروجی آب شنا می کنند، نمونه های لازم از آنها اخذ می گردد. در لاروها و بچه ماهیان با طول کمتر از چهار سانتی متر کل ماهی به آزمایشگاه ارسال می شود و در ماهیان بزرگتر از **طحال، قسمت قدامی کلیه، قلب** نمونه برداری و در محلول نگهدارنده (الکل ۸۰ تا ۱۰۰ درجه) به آزمایشگاه ارسال می شود. نمونه های اخذ شده از حداکثر ۱۰ قطعه ماهی در یک ظرف مخلوط و ارسال می شود.

جدول شماره ۷: تعداد بازديد و نمونه برداري جهت مراقبت از بيماري VHS در مراکز تکثير

نوع مزرعه	تعداد بازديد در سال	تعداد نمونه برداري در سال	بازديد اول			بازديد دوم		
			مولد	نوع نمونه	تعداد	لارو يا بچه ماهي	نوع نمونه	تعداد نمونه
مزارع تکثير داراي ماهي مولد و بچه ماهي	۲	۲	۳۰+۳۰	مايع تخم داني و اسپرم	بر اساس جدول	*	طحال، کليه، قلب	۳۰
روش آزمايش								مولد: کشت بچه ماهي: RT- qpcr

نمونه برداري جهت کشت ويروسي (از مولدين):

نمونه برداري از مولدين با هماهنگي با پرورش دهنده و در زمان تخمگيري انجام شود. انتخاب مولدين به صورت تصادفي انجام مي شود، تعداد مولدين مورد نمونه برداري ۳۰ مولد ماده مي باشد. نمونه حاوي تخم و مايع تخم داني جدا شده از ۱۰ مولد در يك ظرف استريل ريخته و كاملا با هم مخلوط شود و از اين نمونه مخلوط ۵ سي سي مايع تخم داني اخذ شود و در محيط انتقالی VTM و با حفظ زنجيره سرد حداكثر طی مدت ۴۸ ساعت به آزمايشگاه (با حفظ زنجيره سرد) به آزمايشگاه مرکز ملي تشخيص بيماريهاي سازمان دامپزشكي کشور ارسال گردد. در كل از هر مزرعه در نهايت ۳ لوله حاوي مايع تخم داني تهيه مي شود.

نمونه ها در مجاورت يخ و با حفظ زنجيره سرد ارسال گردد.

۴,۱,۶. بيماري نكروز عفوني پانكراس IPN

بيماري ويروسي آزادماهيان پرورشي است. ويروس از گونه هاي مختلف آبزيان جداسازي شده است ولي تظاهرات باليني آنها متفاوت با IPN است. ويروس از خانواده بيروناويريده و جنس آکوابيرنا ويروس مي باشد. بيرونا ويروسها انتشار جهاني داشته و طيف وسيعي از ماهيان را مبتلا مي کنند.

علائم باليني:

اولين علامت وقوع بيماري در لارو آزادماهيان، مشاهده يك افزايش ناگهاني در تلفات روزانه بويژه در ماهيان با رشد سريعتر است. شنای چرخش يا مارپيچ، تيره شدن رنگ بدن، اتساع محوطه بطني، عدم وجود غذا در روده، مشاهده رشته هاي مدفوعي ضخيم و طويل سفيد رنگ و مشاهده پتشي بر روي محوطه بطني و بويژه باله هاي شكمي است.

علائم کالبدگشایی:

خالی بودن روده ها و معده و وجود یک مخاط شیری یا شفاف در آنها، رنگ پریدگی غیرمعمول طحال، کلیه، کبد و قلب و وجود خونریزی های سرسوزنی بر روی سکوم، بافت چربی و وجود یک مایع آسیت مانند در محوطه بطنی

تعریف مورد مشکوک به بیماری IPN:

۱- وجود علائم کالبدگشایی مربوط به بیماری همراه یا بدون علائم بالینی

۲- مشاهده ضایعات سلولی در کشت ویروس قبل از تأیید

تعریف مورد قطعی به بیماری IPN

تشخیص بیماری IPN در صورتی قطعی است که علاوه بر موارد فوق (موارد مشکوک به بیماری) یک و یا بیش از یک مورد از موارد ذیل نیز مشاهده شود.

۱. جداسازی ویروس در کشت سلول که متعاقباً به یک روش سرمی مانند ELIZA، IFAT، خنثی سازی و یا

ایمونوهیستوشیمی تأیید شود، روش مولکولی که متعاقباً با سکانس ژنی تأیید شود و یا Real time RT-

PCR

۲. تشخیص ویروس در بافت به روش مولکولی RT-PCR و متعاقب آن سکانس ژنی و یا به روش real time

PCR

جمعیت هدف نمونه برداری:

آزادماهی

نمونه برداری:

نمونه برداری جهت آزمایش مولکولی:

در صورتی که در جمعیت مورد نمونه برداری ماهیان بی حال، درحال مرگ و یا دارای شنای غیرطبیعی وجود دارد و یا ماهیانی که در خروجی آب شنا می کنند، نمونه های لازم از آنها اخذ می گردد. در لاروها و بچه ماهیان با طول کمتر از چهار سانتی متر کل ماهی به آزمایشگاه ارسال می شود و در ماهیان بزرگتر از طحال، قسمت قدامی کلیه، قلب نمونه برداری و در محلول نگهدارنده (الکل ۸۰ تا ۱۰۰ درجه) به آزمایشگاه ارسال می شود.

نمونه های اخذ شده از حداکثر ۱۰ قطعه ماهی در یک ظرف مخلوط و ارسال می شود.

جدول شماره ۸: تعداد بازديد و نمونه برداري جهت مراقبت از بيماري IPN در مراکز تکثير

نوع مزرعه	تعداد بازديد در سال	تعداد نمونه برداري در سال	بازديد اول			بازديد دوم			روش آزمايش
			مولد	نوع نمونه	تعداد	لارو يا بچه ماهي	نوع نمونه	تعداد نمونه	
مزارع تکثير داراي ماهي مولد و بچه ماهي	۲	۲	۳۰+۳۰	مايع تخمداني و اسپرم	بر اساس جدول	*	طحال، کليه، قلب	۳۰	مولد: کشت بچه ماهي: RT- qPCR

نمونه برداري جهت کشت ويروسي (از مولدين):

نمونه برداري از مولدين با هماهنگي با پرورش دهنده و در زمان تخمگيري انجام شود. انتخاب مولدين به صورت تصادفي انجام مي شود، تعداد مولدين مورد نمونه برداري ۳۰ مولد ماده مي باشد. نمونه حاوي تخم و مايع تخمداني جدا شده از ۱۰ مولد در يك ظرف استريل ريخته و كاملا با هم مخلوط شود و از اين نمونه مخلوط ۵ سي سي مايع تخمداني اخذ شود و در محيط انتقالی VTM و با حفظ زنجيره سرد حداکثر طی مدت ۴۸ ساعت به آزمايشگاه (با حفظ زنجيره سرد) به آزمايشگاه مرکز ملي تشخيص بيماريهاي سازمان دامپزشكي کشور ارسال گردد. در کل از هر مزرعه در نهايت ۳ لوله حاوي مايع تخمداني تهيه مي شود.

نمونه ها در مجاورت يخ و با حفظ زنجيره سرد ارسال گردد.

جدول شماره ۹: بيماريهاي تحت مراقبت بر حسب گونه هاي ماهي و نوع نمونه ها

بيماري	نوع ماهي	مولد	تعداد نمونه	بچه ماهي	تعداد نمونه
VHS	آزادماهيان	*	۳۰	*	۳۰
IHN	آزادماهيان	*	۳۰	*	۳۰
IPN	آزادماهيان	*	۳۰	*	۳۰

۱۵۰	*			خاویاری- ماهیان جنوب ماهیان وارداتی (سی باس و سی بریم)- سوف	VNN
۷۵	*	—		ماهیان گرمابی دریای شمال	KHV- SVC
۱۵۰	*			ماهیان جنوب (هامور، صییدی...) - ماهیان وارداتی (سی باس و سی بریم)- سوف	RSIVD

جدول شماره ۱۰: ماهیان تحت مراقبت بر حسب بیماریهای تحت مراقبت

نوع ماهی	مولد	بچه ماهی	IPN	IHN	VHS	KHV	SVC	RSIVD	VNN
آزاد ماهیان	*	*	*	*	*				
خاویاری		*							*
ماهیان گروه گرمابی (سفید، کلمه، کپور) (صرفاً مراقبت بالینی)	*	*				*	*		
ماهیان جنوب (هامور، شانک، صییتی....) - ماهیان وارداتی (سی باس و سی بریم)		*						*	*
سوف ماهی	*	*						*	*

جدول شماره ۱۱: تعداد بازديد و نمونه برداري از مراکز تکثير ماهيان دريائي (آبهاي داخلي و قفس)

نوع مرکز	بیماری هدف							بازديد اول		بازديد دوم		روش آزمایش
	IHN	IPN	VHS	VNN	KHV	SVC	RSIVD	تعداد نمونه برداري در سال	مولد	تعداد	لارو يا بچه ماهی	تعداد نمونه
آزادماهيان	*	*	*					۲	*	۳۰	*	۳۰
	*	*	*								*	۱۵۰
خاوياري								۱				
				*						۳۰	*	مولکولي
بازسازي ذخاير شمال ماهی سفيد - کلمه - کپور					*	*		۱ بار بازديد	*		*	مراقبت باليني (در صورت مشاهده مورد مشکوک ۱۰ عدد)
												مولکولي
ماهی سوف								۱			*	۷۵
				*			*				*	مولکولي
ماهيان خليج فارس(بومي و وارداتي)				*			*	۱			*	۱۵۰
												مولکولي

نکته: در صورت مشاهده علائم باليني و يا کالبدگشايي مشکوک به ساير بيماريها ضمن گزارش سريع به دفتر بهداشت و
 مدیریت بيماريهای آبزيان و هماهنگی، نمونه های لازم اخذ و ارسال گردد.

جدول شماره ۱۲: نوع نمونه، ماده نگهدارنده و آزمایشگاه محل ارسال نمونه ها

نوع نمونه	ماده نگهدارنده		آزمایشگاه
	مولد	بچه ماهی	
VNN	-	مغز، چشم، طناب عصبی	گیلان- بوشهر-هرمزگان
RSIVD	-	طحال، کلیه، قلب	گیلان- بوشهر-هرمزگان
KHV	-	طحال، کلیه و آبشش	مرکز ملی تشخیص (با توجه به انجام مراقبت بالینی هماهنگی قبلی صورت گیرد)
SVC	-	طحال، کلیه و آبشش	مرکز ملی تشخیص (با توجه به انجام مراقبت بالینی هماهنگی قبلی صورت گیرد)
IHN	مایع تخمدانی	طحال، کلیه و قلب	آزمایشگاههای منطقه ای- مرکز ملی تشخیص مایع تخمدانی و اسپرم در VTM و ارگان ها در الکل
VHS	مایع تخمدانی	طحال، کلیه و قلب	آزمایشگاههای منطقه ای- مرکز ملی تشخیص مایع تخمدانی و اسپرم در VTM و ارگان ها در الکل
IPN	مایع تخمدانی	طحال، کلیه و قلب	آزمایشگاههای منطقه ای- مرکز ملی تشخیص مایع تخمدانی و اسپرم در VTM و ارگان ها در الکل

ب) بیماریهای باکتریایی، انگلی و قارچی:

در صورت رخداد تلفات و یا مشاهده علائم بالینی مشکوک به آلودگیهای انگلی و یا باکتریایی نمونه های لازم اخذ و ارسال می گردد.

۴,۲. برنامه مراقبت فعال از مزارع پرورش در قفس (آبهای داخلی و ساحلی)

در مراکز پرورش برنامه مراقبت به صورت بازدید، نمونه برداری و بررسی بالینی و کالبدگشایی و در صورت لزوم ارسال نمونه به آزمایشگاه (بر اساس جدول شماره ۱۲) جهت بیماریهای مورد نظر می باشد. بیماریهای با اهمیت در کشور که بایستی در این بخش تحت مراقبت باشند شامل:

IPN(Infectious pancreatic necrosis)
 IHN(Infectious hematopoietic necrosis)
 VHS(Viral haemorrhagic septicemia)
 VNN(Viral nervous necrosis)
 RSIVD(Red sea bream iridoviral disease)
 KHVD(Koi herpes virus disease)
 SVC(Spring viraemia of carp)

۴,۲,۱. بیماریهای ویروسی

۴,۲,۲. بیماریهای باکتریایی (مایکوباکتریوزیس، ویبریوزیس، فورونکولوزیس، استرپتوکوکوزیس، پاستورلوزیس، ایتیلوسیسیتیس، بیماری باکتریایی کلیه و ..)

Epizootic ulcerative syndrome
 Branchiomycosis

۴,۲,۳. بیماریهای قارچی

۴,۲,۴. بیماریهای انگلی شامل تک یاخته ایها و پریاخته ایها

جدول شماره ۱۳: تعداد بازدید و نمونه برداری از مراکز پرورش (آبهای داخلی و قفس)

نوع مزرعه		تعداد بازدید در سال	تعداد نمونه برداری در سال	تعداد نمونه اخذ شده در هر بازدید در هر سایت				تعداد دفعات نمونه برداری بر اساس معاینه و یا آزمایش	
				بچه ماهی	وزن ۱۰۰- ۵۰۰ گرم	بالاتر از ۵۰۰ گرم	بالینی و کالبدگشایی	آزمایشگاه	آزمایشگاه
								بیماری	روش آزمایش
مزارع پرورش خاویاری		۲	۲	۵	در صورت لزوم	در صورت لزوم	۲	در صورت لزوم	در صورت لزوم
مزارع پرورش دریایی (مراکز پرورش)		۲	۲	۱۰	۵	۵	۲	در صورت لزوم	در صورت لزوم
پرورش در قفس آبهای داخلی (قزل آلا)		۲	۲	۳۰	۱۰	۱۰	۲	۱	-VHS *IHN Real time PCR
پرورش در قفس آبهای داخلی (سایر گونه ها)		۲	۲	۱۰	۱۰	۵	۲	در صورت لزوم	
پرورش در قفس دریا (قزل آلا)		۲	۲	۳۰	۱۰	۱۰	۲	۱	VHS-IHN Real time PCR
پرورش در قفس دریا (سایر گونه ها)		۳	۳	۱۰	۱۰	۵	۲	در صورت لزوم	
مراکز قرنطینه ماهیان دریایی وارداتی **		هر محموله	هر محموله	۱۵۰	۳۰	—	هر محموله	پایان هر دوره قرنطینه از هر محموله ۱۵۰ ماهی	VNN-RSIVD Nested-PCR پاتولوژی

* نمونه برداری در زمان های که دمای آب حداقل به مدت دو هفته کمتر از ۱۴ درجه سانتی گراد می باشد، صورت می پذیرد.

** مراکز قرنطینه ماهیان دریائی وارداتی هر محموله بازدید شده و پیش از خروج از قرنطینه نمونه برداری لازم جهت آزمایشهای مورد نظر (بسته به گونه ماهی انجام می شود).
نمونه های اخذ شده از نظر بالینی و کالبدگشایی بر اساس تعریف بیماریهای مورد نظر، تحت بررسی بالینی قرار می گیرند و فرمهای مربوط در سامانه GIS تکمیل و ارسال می گردد.
در برنامه مراقبت از مراکز پرورش در صورت مشاهده علائم بالینی و یا کالبدگشایی مشکوک به هر یک از بیماریهای ویروسی، باکتریایی، انگلی، قارچی و ... نمونه برداری لازم جهت ارسال به آزمایشگاه اخذ خواهد شد.

۴,۳ مراقبت غیرفعال

مراقبت غیرفعال از کلیه مراکز تکثیر، پرورش و قفس و منابع آبی بر اساس دریافت گزارش از ذی نفعان، دامپزشکان بخش خصوصی و ... مبنی بر مشاهده علائم بالینی و یا تلفات و همچنین آزمایشگاههای بخش دولتی و خصوصی و آموزشی-تحقیقاتی مبنی بر جداسازی عوامل بیماریزا می باشد.
پس از دریافت گزارش مربوطه بخش دولتی اقدام به بازدید و نمونه برداری می نماید.

نمونه برداری تشخیصی جهت آزمایشات مراقبت غیرفعال:

در هنگام نمونه برداری جهت انجام آزمایشات تشخیصی، بایستی ضمن رعایت اصول امنیت زیستی و بهداشت فردی، اصول نمونه برداری رعایت شده و مشخصات نمونه (بیومتری، گونه، جنس، سن و ...) ثبت شود و نمونه برداری به منظور انجام آزمایشات انگلی، قارچی، باکتریایی، ویروسی و هیستوپاتولوژی صورت می گیرد.
پس از اخذ تعداد لازم نمونه جهت انجام آزمایشات تشخیصی (۱۰ عدد ماهی دارای علائم بالینی) نمونه ها به شرح ذیل آماده سازی و مورد آزمایش قرار می گیرد.
در ابتدا، بازبینی ظاهری ماهی صورت گرفته و سطح بدن ماهی و آبشش ها از نظر وجود جراحات جلدی، انگل های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد آزمایش قرار می گیرند. عضلات، دستگاه گوارش و اندامهای داخلی بایستی، از نظر وجود انگل های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، مورد بازبینی قرار گیرند.

سپس برای انجام آزمایش باکتریایی، با یک آنس استریل یا پیت پاستور بلند از سطوح پوست، باله، آبشش و یا محل جراحات نمونه تهیه شده و بر روی محیط های نوترینت آگار (NA)، Ordal agar، TCBS و TSA (با افزودن ۲٪ نمک) و یا محیط کشتهای اختصاصی کشت داده شود و محیط های کشت در دمای مطلوب تا زمان رشد کلنی

های مشکوک نگهداری شده و در صورت رشد کلنی، آزمایشات تفریقی انجام شده و در صورت عدم امکان آزمایشات تفریقی، تا زمان ارسال در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و با حفظ زنجیره سرد به سازمان ارسال گردد.

پس از آن در شرایط استریل اقدام به کالبدگشایی نموده و ضمن بازبینی ظاهری اندام های داخلی، از اندام های هدف، گسترش تهیه شده و رنگ آمیزی گرم انجام می شود و همچنین بر روی محیط های کشت گفته شده، کشت باکتریایی داده می شود.

سپس از تعداد ۱۰ قطعه ماهی بسته به نوع بیماری مورد نظر اندام های کلیه قدامی، کبد، طحال، قلب، آبشش، چشم و مغز هر ماهی را جدا ساخته و قسمتی از هر یک را در اتانول ۹۰٪ (جهت انجام آزمایشات S.N.T و PCR) به مقدار ۵ گرم و به نسبت ۱ به ۵ قرار داده، در اسرع وقت به مرکز ارسال گردد.

نکته: در صورت نیاز به انجام آزمایش کشت سلولی، نمونه ها بایستی در محیط *VTM (Viral Transfer Media)* قرار گرفته و در مدت کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال گردد.

به منظور انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی، از اندام های کلیه، کبد، قلب و طحال ، آبشش، چشم و مغز (بسته به نوع بیماری) به حجم یک سانتیمتر مکعب و یک عدد چشم (که به دو نیم تقسیم شده باشد و یا به داخل آن فرمالین تزریق شده باشد) و قسمتی از مغز که به طور سالم برداشته شده است، بایستی، به نسبت ۱ به ۱۰ در محلول فرمالین سالین بافر شده ۱۰٪ قرار گرفته و ارسال شود.

نکات بهداشتی لازم در حین بازدید از مراکز تکثیر و پرورش دریایی

- حداقل ۴۸ ساعت پیش از بازدید از مراکز تکثیر ماهیان دریایی هیچ بازدیدی از مراکز تکثیر و یا پرورش آبزیان انجام نشده باشد. همچنین تردد و بازدید در آزمایشگاه نیز صورت نگرفته باشد لذا امکان بازدید دو و یا چند مرکز در یک روز امکان پذیر نخواهد بود.
- در زمان بازدید از کلیه مراکز تکثیر، پرورش، پرورش در قفس و الزاماً بایستی از پوشش های یک بار مصرف و یا لباس و کفش مرکز استفاده شود.
- خودروهای مربوط به اکیب بازدید و نمونه برداری در خارج از محوطه مربوط به مراکز متوقف شود.
- در صورت بازدید از دو مرکز پرورش در یک روز کلیه وسایل مربوط به نمونه برداری و ارسال نمونه اختصاصی باشد.