# طراحی و معرفی کیت تشخیصی یرسینیوز ماهی قزل آلا براساس Multiplex PCR

محمد رضا روزبهانی[۱]، مژگان بنده پور[۲]، عادل حقیقی خیابانیان اصل[۳]، حمید عبداللهی[۴]، *بهرام کاظمی[۲و۵]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحدعلوم وتحقیقات، دانشکده کشاورزی ومنابع طبیعی-گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، تهران، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی- گروه پاتولوژی، تهران، ایران

۴-سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، موسسه اصلاح و تهیه نهال وبذر، تهران، ایران

۵- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه انگل شناسی، تهران، ایران

**چکیده:** یرسینیا راکری عامل بیماری دهان قرمز روده ای[۱] آبزیان است که سالانه موجب خسارات هنگفتی به صنعت آبزی پروری و کشاورزی درایران و جهان می گردد . از دهه ۱۹۵۰ تا کنون روش های متعددی به منظور پایش وتشخیص این بیماری در کارگاه های پرورش قزل آلا در سراسرجهان ابداع شده است. سنجشهای مبنی بر اسیدهای نوکلئیک و استفاده ازتکنیک PCR، مدرن ترین و دقیق ترین روش ابداعی در تشخیص بیماری ها می باشند و دارای پتانسیل بالایی نسبت به سایر روشها ی سنتی هستند. دراین مطالعه تهیه یک کیت تشخیصی برای تشخیص این بیماری معرفی میگردد. درطراحی این کیت از واکنش MultiplexPCR استفاده شده است که حاوی پرایمرهای اختصاصی تشخیص یرسینیا راکری وژن

[1] Enteric red mouth disease (ERM)

SrRNA 18ماهی قزل آلا می باشد. این کیت علاوه برحصول اطمینان ازانجام واکنش درون هرویال ( وجود کنترل) ، تشخیص قطعی بیماری را درکوتاه ترین زمان ممکن میسرمی سازد.

**واژگان کلیدی**: ماهی قزل آلا، یرسینیا راکری، MultiplexPCR

* نویسنده مسئول: بهرام کاظمی – استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی. تلفن: ۲۲۴۳۹۹۵۶- Email: Bahram_14@yahoo.com

**مقدمه:**

یکی ازشایع ترین بیمارهای باکتریائی در مزارع پرورش ماهی قزل آلا ( آزاد ماهیان) بیماری یرسینوزیس یا بیماری دهان قرمز روده ای است.[2] این بیماری اولین بار در دهه ۱۹۵۰ و از یک کارگاه پرورش ماهی قزل آلا در ایداهو امریکا واقع در دره هگرمن گزارش شد (۱)

باکتری یرسینیا راکری یک باکتری، کوکوباسیل گرم منفی میله ای شکل با دنباله های شفاف وگرد[3] بی هوازی به ابعاد µm ۳-۱ ×۰/۸ – ۰/۵ می باشد (۱،۲) که موجب سپتی سمی همراه با خونریزی سطحی و داخلی در ماهی قزل آلا و خسارات اقتصادی قابل توجه به صنعت پرورش آبزیان می گردد. از نظر بالینی، این بیماری شبیه سپتی سمی های باکتریایی گرم منفی بویژه فرونکولوزیس است وخونریزی در قاعده باله ها، داخل و اطراف دهان، اگز و فتالمی دو طرفه همراه یا بدون خونریزی، تیرگی پوست،

2 - Enteric Red mouth Disease(ERM)

3 with rounded end

خونریزی های چشم و اطراف مقعد ازجمله علائم بالینی خارجی آن می باشد. ازنظرداخلی، خونریزی های کوچک روی اندام هایی مثل کبد، پانکراس ( لوزالمعده) روده بزرگ [4]بادکنک شنا [5]و عضلات جانبی قابل روئیت است. در ماهیان بیمار طحال بزرگ، سیاه و تیره شده و روده متورم و مملو از مایعات چرکی کدر هستند. از اینرو التهاب همراه با خونریزی در ناحیه خلفی روده، تجمع مایع آبکی در معده و روده ها[۶] ، بزرگ شدن بافت های خون ساز کلیه و طحال از دیگر علائم پاتولوژی بالینی این بیماری است(۳).

عدم تشخیص قطعی عامل بیماری زا درآبزیان، منجربه افزایش کاربرد آنتی بیوتیک های مبتنی برتجربه شده و ضمن اینکه ممکن است به درمان قطعی منتهی نگردد، باعث توسعه مقاومت های داروئی نیز می شود، از اینرو طولانی شدن زمان شناسایی و تشخیص عامل بیماری زا موجب شیوع بیشتر بیماری، افزایش تلفات در کارگاه های پرورش قزل آلا و هزینه های ناشی از آن می گردد.

تشخیص قطعی، سریع و اقدام موثر برای بیماری هایی مانند یرسینیوزیس که شیوع شان در مراکز پرورش قزل آلا بسیار سریع است، از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

باتوجه به اینکه تشخیص سنتی این بیماری برپایه آنالیزعلائم کلینیکی، روش های میکروسکوپی ، کشت و تشخیص آن با آزمایشات بیوشیمیایی و یا سرولوژیک زمان بر و وابسته به پاتوژن است ( ۶،۷) توسعه روش های ملکولی مانند PCR و بهره مندی ازمزیت هایی چون سرعت، دقت و حساسیت فوق العاده آن در تشخیص بیماری ها، رشد چشمگیری داشته است (۸،۹). علیرغم همه مزایای یادشده ،تکنیک PCR بشدت متاثرازخطاهای انسانی، شرایط محیطی، بازدارنده های واکنش، کیفیت و کمیت اجزاء

4 - pyloric caeca

5- Swim bladder

6 - Exophthalmia

تشکیل دهنده واکنش می باشد در نتیجه اخذ نتایج منفی نادرست درآزمایشات تشخیصی مبتنی بر PCR دور از انتظار نیست و این یکی از اصلی ترین نقاط ضعف تکنیک PCR در تشخیص بیماری ها می باشد.

صور مختلفی از کاربرد تکنیک PCR در تشخیص عامل باکتریایی مولد بیماری یرسینیوزیس توسط محققین و دانشمندان بسیاری پیشنهاد شده است(۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴) که از آن جمله می توان ازموارد متعددی چون (simple PCR ، RFLP, Multiplex PCR, PCR-ELISA & ...) نام برد.

در این تحقیق کیت تشخیصی بر مبنای PCR برای تشخیص یرسینیوز درماهی قزل آلا طراحی و معرفی می شود.

## مواد و روش ها

نمونه گیری

باکتری یرسینیا راکری ازسازمان دامپزشکی کشورتهیه شد ودر محیط TSA کشت داده شد. با مجوزسازمان دامپزشکی کشورنمونه های بافت ماهی قزل الا ی الوده ازکارگاههای پرورش ماهی قزل الا در استانهای ..... جمع اوری گردید و بصورت یخ زده یا نگهداری درالکل اتیلیک ۲۰ درصد به ازمایشگاه منتقل شدند.

**استخراج** DNA

کلنی های باکتری ازمحیط کشت جمع اوری ودر بافر لیز کننده (320 mM sucrose, 10 mM Tris, 5 mM MgCl2, 1% SDS) سوسپانسیون شدند. لوله حاوی واکنش مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه قرار گرفت و سپس با روش جوشانیدن و فنل – کلرو فرم DNA باکتری استخراج گردید و با الکل اتیلیک مطلق رسوب داده شد. DNA بافت ماهی نیز طبق دستورالعمل کیت شرکت Roche استخراج گرید.

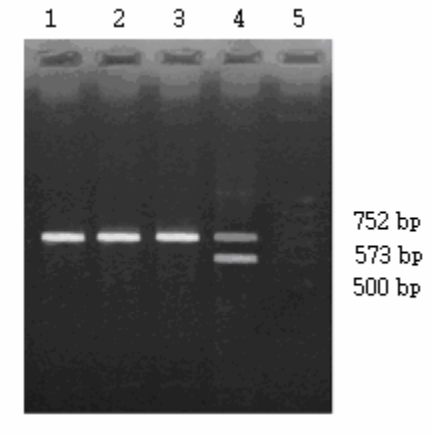
**طراحی پرایمر**: براساس ترادف ژن 16SrRNA باکتری یرسینیا راکری (GenBank accession EU401667) و18SrRNA ماهی قزل آلا (GenBank accession AF308735) دوجفت پرایمر طراحی گردید. پرایمرهای Yer F 5`- CGAGGAGGAAGG GTT AAG T-3 و Yer R 5`- AAGGCACCAAGG CAT CTC T-3 تعداد ۵۷۳ نوکلئوتید را از ژن 16SrRNA باکتری یرسینیا راکری تکثیر میکنند. پرایمر های Omny F 5`- CTGTGGCAATTCTAGAGC-3` و Omny R 5` - CTGCCCTCTTAATCATGG-3` تعداد ۷۵۲ نوکلئو تید از ژن18SrRNA ماهی قزل آلا را تکثیر میکنند.

**انجام واکنش** PCR: واکنش با حجم µl ۲۰ متشکل از ۱/ میکروگرم از DNA ، ۲۰ پیکومول از هریک از پرایمرها ، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 ، ۱۵/ میلی مولارازهریک از dNTP ها تهیه شد. انجام PCR با شرایط زیرانجام گرفت: دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه بمدت ۲ دقیقه< تعداد سی سیکل متشکل از دناتراسیون در ۹۴ درجه بمدت ۳ ثانیه، انیلینگ بمدت ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه و اکستنشن در ۷۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه و نهایتا" واکنش بمدت ۵ دقیقه در حرات ۷۲ درجه قرار داده شد.

**الکتروفورز**: پس از اتمام واکنش مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با مارکر وزنی DNA روی ژل اگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با نور UV طول موج ۲۶۰ ناومتربا دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شد.

**نتایج**: شکل شماره ۱ الکتروفورزمحصول PCR را در ژل اگارز ۱/۵ درصد نشان میدهد. در این کیت کنترل داخلی برای سیستم PCR طراحی شده است. کنترل داخلی در این مطالعه یک قطعه DNA با اندازه

۷۲۵ نوکلئوتید از توالی 18SrRNAژنوم ماهی قزل آلا  می باشد ِ مشاهده واکنش PCR میزبان موید کیفیت ومقادیراجزاء واکنش PCR و سلامت سیستم می باشدوعدم مشاهده ان بمنزله وجود نقص درسیستم تلقی میگردد. اگر محصول PCR میزبان مشاهده شود وجود یا عدم محصول PCR پاتوژن مورد اعتماد می باشد اما اگر محصول PCR میزبان مشاهده نشد، مثبت یا منفی بودن پاتوژن مورد سئوال میباشد و باید نقص سیستم را جستجو کنیم.  بعد از set uption  سیستم حداقل بیست نمونه مشکوک با کیت تولیدی آزمایش شدند.




شکل شماره ۱: الکتروفورز محصول  PCR  روی ژل اگارز. ستون های ۱، ۲، ۳ نمونه های منفی را نشان میدهد که فقط محصول  PCR  میزبان ( ماهی قزل الا) مشاهده میشود و ستون شماره ۴ محصول  PCR  نمونه مثبت ( از نظر یرسینیا) میباشد که در ان محصول  PCR  میزبان و پاتوژن مشاهده میگردد.  ستون شماره ۵ مارکر وزنی  DNA  (100 bp DNA ladder marker) را نشان می دهد.

جدول۵--نتایج آزمایشات PCR جهت ردیابی عامل بیماری زا یرسینیا راکری

| نتایج | تعداد گارگاه مشکوک به آلودگی | درصد |
|---|---|---|
| مثبت | ۲ | ۱۰ |
| منفی | ۱۸ | ۹۰ |
| جمع | ۲۰ | ۱۰۰ |

**بحث:**

در حال حاضر بیماری یرسینیوزیس دارای پراکنش جهانی می باشد و به عنوان یک بیماری اندمیک در اکثر کشور های تولید کننده ماهی قزل آلا پرورشی و سایر میزبانان طبیعی آن در زیستگاه های آبی به شمار می رود. برابرآمار انجمن ماهی قزل آلای بریتانیا ارزش سالانه خسارات حاصل از این بیماری به صنعت پرورش قزل آلا با احتساب هزینه های مربوط به تلفات، کاهش رشد، کاهش ضریب تبدیل خوراک، مصرف آنتی بیوتیک ها وتاخیر در برداشت ناشی از بروز بیماری، رقمی حدود۱۰٪ کل هزینه های تولید این صنعت می باشد(۱۵)

با التفات به اهمیت صنعت پرورش آبزیان دربخش کشاورزی کشور و از طرف دیگر بدلیل تعدد زیستگاه های طبیعی و مصنوعی آزاد ماهیان و میزبانان این بیماری از جمله تاس ماهیان، تشخیص قطعی

بیماری حاصل ازعامل مولد یرسینیوزیس درکارگاه های پرورش قزل آلای کشورازاهمیت ویژه ای برخوردار است.

امروزه با تکثیر DNA میکرو ارگانیسم و با استفاده از پرایمر اختصاصی آن می توان به تشخیص عامل مولد بیماری در نمونه های مشکوک دست یافت (۱۴، ۹ ). باکتری ها دارای سکانس ژنی 16SrRNA هستند که درتوالی درموجودات دیگر مشاهده نمی شود و هدف خوبی برای PCR می باشد.

با توجه به اینکه آزمایشات PCR بشدت متاثر از خطاهای انسانی و شرایط محیطی مانند تنوع ترموسایکلر، کارایی متفاوت دی ان آ پلیمرازها۷ وحضوربازدارنده های واکنش PCRمانند کمپلکس های پلی ساکاریدی 8می باشد، اخذ نتایج منفی نادرست در آزمایشات تشخیصی دور از انتظار نیست(۱۶) لذا وجود یک کنترل داخلی در هرمیکروتیوب و بررسی انجام واکنش برای رفع این نقیصه ایده جالبی بنظر میرسد. در این تحقیق براساس ترادف ژن 16SrRNA باکتری یرسینیا راکری(EU401667) و ژن و 18SrRNAماهی قزل آلا (AF308735) بعنوان میزبان، پرایمرهایی برای تشخیص عامل بیماری وهم چنین کنترل واکنش PCR ، طراحی و در قالب یکMultiplexPCR بکار برده شد. در هر واکنش باید محصول PCR مربوط به میزبان مشاهده شود که خود مبین صحت انجام واکنش می باشد وعدم روئیت ان نشان دهنده نقص در انجام واکنش می باشد. بنابراین همیشه حتی در نمونه های منفی هم محصول PCR مربوط به میزبان باید وجودداشته باشد.

7- DNA polymerases

8-Polysaccharides complex

Refrence

1- Rucker R. (1966) Redmouth disease of rainbow trout (Salmo gairdneri). Bulletin de L_ Office International des Epizooties 65,825–830.

2- Tobback. E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F and Chiers K (2007).Yersinia ruckeri infections in salmonid fish. Journal of Fish Diseases ; 30: 257–268 .

3- Avci H, Birincioglu SS (2005). Pathological findings in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) experimentally infected with Yersinia ruckeri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences; 29: 1321–1328.

4- Aquavac total strategies against enteric redmouth disease in farmed Rainbow Trout (2007). www.avl.co.uk

5- Bleyen. N, De Gussem K, De Gussem J, Goddeeris B (2007). Specific detection of Histomonas meleagridis in turkeys by a PCR assay with an internal amplification control. Vet. Parasitol; 143(3-4): 206-213.

6- Furones MD, Gilpin ML, Munn CB. (1993). Culture media for the differentiation of isolates of Yersinia ruckeri base on detection of a virolence factor. J Appl Bacteriol; 74(4): 360-366

7- Rodgers CJ. (1992).Development of a selective-differential medium for the isolation of Yersinia ruckeri and its application in epidemiological studies. J Fish Dis 15:243–254

8- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D.(1994). PCR primers and Probes for the 16SrRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria , Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. J Cli Microbiol; 32 (2): 335-351 .

9- Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Dominguez L, Fernandez JF (1999). Development of a PCR assay for detection ofYersinia ruckeri in tissues of inoculated and naturally infected trout. Appl. Environ. Microbiol; 65: 346–350.

10- genton. F, et al. (1996). Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization testsand PCR-based diagnosis of Yersinia ruckeri Dis Aquat Orga; 24: 121-127.

11- Altinok I, Grizzle JM, Liu Z. (2001). Detection of Yersinia ruckeri in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis Aquat Organ; 44(1): 29-34.

12- DelCerro A, Marquez I and Guijarro JA (2002). Simultaneous Detection of Aeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum, and Yersinia ruckeri, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. Appl Environ Microbiol; 68(10): 5177–5180

13- Olsson C, Ahrné S, Pettersson B, Molin G (2004). DNA based classification of food associated Enterobacteriaceac previously identified by biolog GN microplates sytem. Appl.Microbiology; 27 (2): 219-228 .

14- Wilson T,et al. (2003). Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. Dis Aquat Organ; 54(2): 127-134.