مقایسه دو روش هیستوپاتولوژی و Multiplex-PCR در تشخیص بیماری یرسینیوز (*Yersinia ruckeri*) در تعدادی از مزارع پرورشی ماهیان قزل‌آلای کشور

عادل حقیقی‌خیابانیان‌اصل*[۱]، محمدرضا روزبهانی[۲]، بهرام کاظمی[۳]

چکیده

یرسینیا راکری عامل بیماری دهان قرمز روده‌ای (Enteric red mouth disease) آبزیان است که سالانه موجب خسارات هنگفتی به صنعت آبزی‌پروری و کشاورزی در ایران و جهان می‌گردد. تشخیص قطعی، سریع و اقدام موثر برای بیماری‌هایی مانند یرسینیوز که شیوع شان در مراکز پرورش قزل‌آلا بسیار سریع است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این تحقیق مقایسه دو روش تشخیصی هیستوپاتولوژی و Multiplex- PCR در تشخیص بیماری یرسینوز یا بیماری دهان قرمز روده‌ای (ERM) در ماهی قزل‌آلا در ایران است.

در این مطالعه در آزمایشات مبتنی بر PCR ، DNA مورد استفاده در هر واکنش PCR از بافت ماهی‌های قزل‌آلای مشکوک به بیماری استخراج و محصول واکنشPCR، با استفاده از ژل الکتروفورز روئیت گردید. در پایش پاتولوژی، از بافت ماهی‌های زنده یا در حال مرگ فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰٪ سالین استفاده شده است. سپس نمونه‌ها در قالب‌های پارافین تثبیت و بوسیله میکروتوم‌های دیجیتال به ضخامت ۷-۵ میلیمتر برش داده شدند. اسلایدهای آماده شده بوسیله هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

در این تحقیق ۲۰ نمونه مشکوک که علائم بالینی مشخص از قبیل سپتی سمی حاد در بافت‌های داخلی و وخونریزی سطحی در اطراف دهان و مقعد از خود بروز می‌دادند، با تکنیک‌های یاد شده مورد ازمایش قرار گرفتند که بر طبق نتایج آزمایشات مولکولی، در نمونه‌های منفی تنها قطعه مربوط به ژن میزبان به عنوان کنترل واکنش PCR تکثیر شده است، که خود این مسئله صحت انجام آزمایش مولکولی را تایید می‌نماید، در مقابل در نمونه‌های مثبت، توالی‌های ژنی میزبان و همچنین پاتوژن یرسینیا هر دو آمپلی فای و تکثیر شده‌اند که بیان کننده تشخیص عامل پاتوژن می‌باشد. از مجموع ۲۰ نمونه مورد آزمایش به روش PCR در مجموع ۲ مورد مثبت و ۱۸ مورد، منفی گزارش شد در مقابل در آزمایشات هیستوپاتولوژی از نمونه‌های مذکور ۵ مورد مثبت و دارای علایم آسیب‌شناسی تیپیک و مشخص بیماری یرسینیوز و ۱۵ مورد، منفی و بدون هیچ‌گونه علایم منتسب به بیماری گزارش شد.

واژگان کلیدی: ***هیستوپاتولوژی، Multiplex- PCR– (ERM) یرسینیوزیس، قزل‌آلا، ایران***

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۵

مقدمه

یرسینیا راکری، کوکوباسیلی گرم منفی و از باکتری‌های بدون اسپور خانواده *Enterobacteriaceae* می‌باشد که اغلب تاژکدار هستند(۱۳و۱٤)

یکی ازشایع‌ترین و مرگبارترین، بیمارهای باکتریائی در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا (آزاد ماهیان) بیماری یرسینوزیس یا بیماری دهان قرمز روده ای(ERM) است. این بیماری اولین بار در دهه ۱۹۵۰ و از یک کارگاه پرورش ماهی قزل‌آلا (*Onchorhynchus mikiss*) در ایداهو امریکا واقع در دره هگرمن گزارش شد(۵و۷و۱۳و۱٤).

این بیماری ممکن است، موجب سپتی سمی همراه با خونریزی سطحی و داخلی در میزبانان حساس خود گردد. از نظر بالینی علائمی چون اگزوفتالمی دو طرفه همراه با خونریزی، خونریزی‌های چشم و اطراف مقعد، تورم روده در نتیجه تجمع مایعات در آن، سپتی سمی‌های عمومی(۳و۷و۱۳و۱٤) همراه با التهاب، خونریزی در اندام‌هایی مثل بادکنک شنا که سیاه و تیره شده، روده متورم و مملو از مایعات چرکی کدر همراه با خونریزی و بزرگی اندام‌های طحال، کلیه در ماهیان بیمار به عنوان شاخصه‌های بالینی و پاتولوژیکی بیماری هستند.

*۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران Haghighi@srbiau.ac.ir

۲- پژوهشکده مهندسی جهاد کشاورزی، تهران، ایران

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

صور مختلفی از کاربرد تکنیک PCR در تشخیص عامل باکتریایی مولد بیماری یرسینیوزیس توسط محققین و دانشمندان بسیاری پیشنهاد شده است(۱و۲و٦و۷و۱۲)

از سوی دیگر یکی از سودمندترین و رایج‌ترین روش‌های پایش یرسینیوزیس، روش آسیب‌شناسی است.(۱۱) ضمن اینکه این روش از بهترین روش‌های تشخیصی است که می توان نتایج حاصل از آنرا با نتایج تکنیک PCR مقایسه و انطباق آنها را مطالعه نمود.

مواد و روش کار

این تحقیق در بازه زمانی مهر ماه ۱۳۸٦ لغایت مهر ماه ۱۳۸۷ در تهران ـ ایران صورت پذیرفته است. کلیه نمونه‌های مورد بررسی در این آزمایش از جمعیت‌های ماهیان قزل‌آلا که علائم اولیه بیماری را از خود بروز داده اند از استان‌های مازندران ـ جاده هراز و گلستان(در قالب نمونه‌های برنامه کنترل بهداشتی) تهیه شده است، که باهماهنگی سازمان دامپزشکی به صورت نمونه‌های در کنار یخ و یا حمل و نگهداری در الکل اتیلیک ۲۰ درصد جهت آزمایشات مولکولی PCR و همچنین حمل و نگهداری در فرمالین ۱۰ درصد سالین جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه منتقل شده‌اند.

نگاره ۱ـ معاینه بالینی ماهیان قزل‌آلای مبتلا به عفونت یرسینیوز به همراه تیرگی رنگ بدن

نگاره ۲ـ معاینه بالینی ماهیان قزل‌آلای مبتلا به عفونت یرسینیوز به همراه زخم و پتشی روی مخاط زبان

نگاره ۳ـ معاینه بالینی ماهیان قزل‌آلا ی مبتلا به عفونت یرسینیوز به همراه اگزوفتالمیا و خونریزی شدید جلدی

آزمایشات مبتنی بر PCR

- **استخراج** DNA

DNA مورد استفاده در واکنش PCR، از ۱/۳ انتهایی بافت روده (25-50*mg*) ماهی های مشکوک به بیماری و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA کمپانی Roche Company, (USA) استخراج شد.

- **پرایمر و واکنش** PCR
- به منظور جلوگیری از اخذ نتایج منفی نادرست در تکنیک PCR، از دو جفت پرایمر مبتنی بر توالی ژن‌های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و

Oncorhynchus mykiss در ماهی 18S rRNA در یک واکنش Multiplex PCR که پیش از این توسط روزبهانی و همکاران ارائه شده، استفاده شد. اطلاعات مربوط به پرایمرهای انتخابی به نام‌های (YER3, YER4 & Onmy F,Onmy R) و شرایط واکنش PCR در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱ـ سکانسینگ پرایمر اختصاصی مربوط به محصول نهایی PCR در آزمایشات تشخیصی

The primer sequences, expected size of products and PCR condition used in diagnostic test.

PCR	Primer name	Primer sequence (۵´-۳´)	Expected size	PCR condition
Multiplex	*YER۳*	۵`- *CGA GGA GGA AGG GTT AAG T*-۳		
	YER٤	۵`- *AAG GCA CCA AGG CAT CTC T*-۳	۵۷۳*bp*	۹٤ °*C* ۲*min*, ۳۰ *cycles* (۹٤ °*C* ۳۰*s*, ۵۵ °*C*
	Omny F	۵`- *CTG TGG CAA TTC TAG AGC* -۳`		۳۰ *sec*, ۷۲ °*C* ۳۰ *sec*) ۷۲ °*C* ۵*min*
	Omny R	۵`- *CGT CCC TCT TAA TCA TGG* -۳`	۷۵۲ *bp*	

هر یک از واکنش‌های یاد شده در حجم نهایی ۲۰ مایکرو لیتر و در دستگاه ترموسایکلر Corbet Research مورد آزمایش قرار گرفت. متشکل از ۱/ میکروگرم از DNA ، ۲۰ پیکومول از هریک از پرایمرها، ۱/۵ میلی مول MgCl2 ، ۰/۱۵ میلی مول از هر یک از dNTP ها تهیه شد. انجام PCR با شرایط زیرانجام گرفت: دناتوراسیون اولیه ۹٤ درجه به مدت ۲ دقیقه و تعداد ۳۰ سیکل متشکل از دناتوراسیون در ۹٤ درجه به مدت ۳ ثانیه، آنیلینگ به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه و اکستنشن در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً واکنش به مدت ۵ دقیقه در حرات ۷۲ درجه قرار داده شد.(۹و۱۰)

- **الکتروفورز**

پس از اتمام واکنش مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید و تابش نور UV با طول موج ۲٦۰ نانومتربا دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی و مشاهده قرار گرفت.(٤) در این مرحله از مارکر وزنی 100bp DNA شرکت فرمنتاس و نمونه کنترل مثبت سازمان دامپزشکی (اخذ شده از آزمایشگاه مرکز تشخیص) استفاده شد.

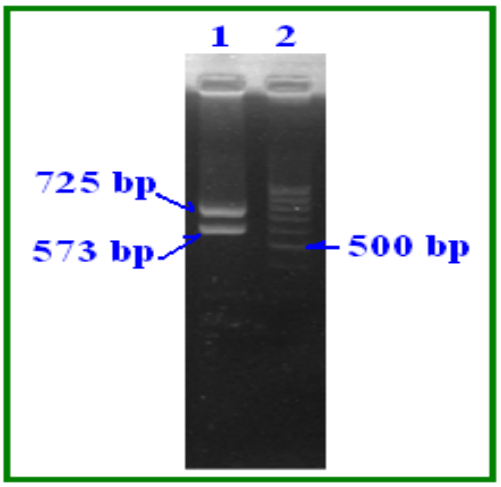
بررسی هیستو پاتولوژی

جهت هیستو پاتولوژی از روش آماده‌سازی استاندارد، استفاده گردید. بطوری که، بافت‌های هدف از جمله کبد، کلیه، طحال و روده ماهی‌های زنده یا در حال مرگ، در محلول فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. سپس نمونه‌ها در قالب‌های پارافین تثبیت و بوسیله میکروتوم دیجیتال به ضخامت ۵–۷ میلیمتر برش داده شدند. اسلایدهای آماده شده بوسیله هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند. (۱۱)

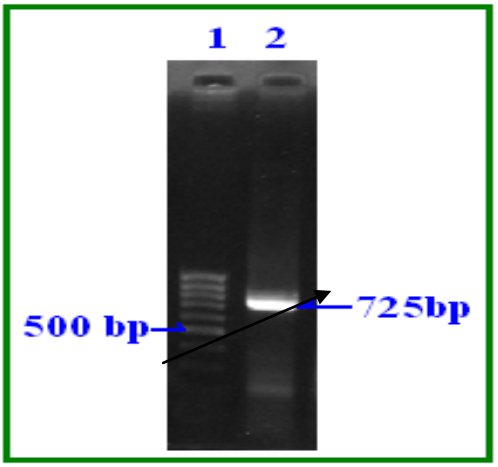
نتایج

در مجموعه آزمایشاتPCR، هر میکرو تیوب محتوی DNA استخراجی از بافت ماهی قزل‌آلای مشکوک به بیماری و جفت پرایمرهای طراحی شده مبتنی بر توالی ژن‌های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و 18S rRNA ماهی قزل‌آلا *Oncorhynchus mykiss*است. نگاره شماره ٤ و ۵ نشان دهنده الکتروفورز محصول Multiplex PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ است بطوری که در نمونه‌های مثبت باندهای bp۵۷۳ و ۷۲۵bp به ترتیب مربوط به ژن‌های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و 18S rRNA ماهی قزل‌آلا *Oncorhynchus mykiss* و در نمونه‌های منفی باند ۷۲۵bp مربوط به ژن 18S rRNA ماهی قزل‌آلا*Oncorhynchus mykiss* به عنوان کنترل واکنش PCR، قابل روئیت است. همانطور که مشاهده می‌شود در نمونه‌های منفی تنها قطعه مربوط به ژن میزبان به عنوان کنترل واکنش PCR تکثیر شده است ،که خود این مسئله صحت انجام آزمایش مولکولی را تایید می نماید، در مقابل در نمونه‌های

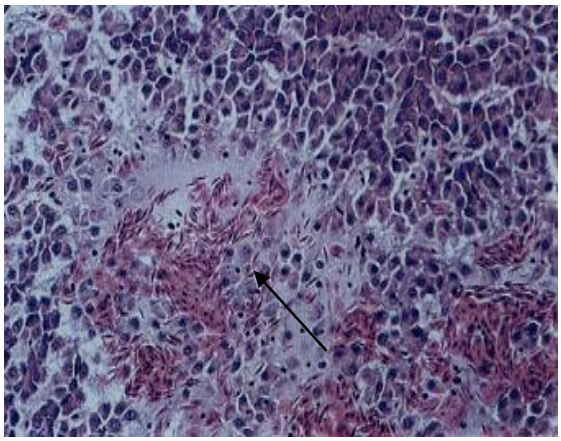
مثبت، توالی‌های ژنی میزبان و پاتوژن هر دو آمپلی فای و تکثیر شده‌اند. از مجموع ۲۰ نمونه مورد آزمایش به روش PCR در مجموع ۲ مورد مثبت و ۱۸ مورد، منفی گزارش شد در مقابل در آزمایشات هیستوپاتولوژی از نمونه‌های مذکور ۵ مورد مثبت و۱۵ مورد، منفی گزارش شد.(جدول شماره ۲) همانطور که درا شکال شماره ۵و٦و۷ نشان داده شده است، خونریزی و ایجاد کانون‌های نکروتیک و هجوم کلنی‌های باکتریایی در بافت‌های کبد، کلیه و طحال قابل مشاهده است(۸).



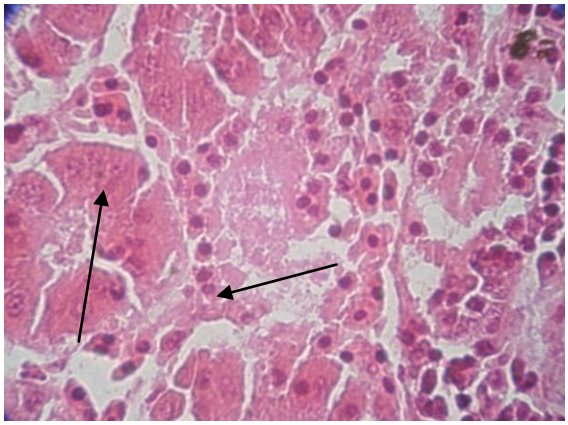
نگاره ٤– الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ . در نمونه‌های مثبت هر دو باند مربوط به محصول PCR تکثیر شده از ژن ماهی و ژن پاتوژن در کنار مارکر 100bp قابل رویت است.



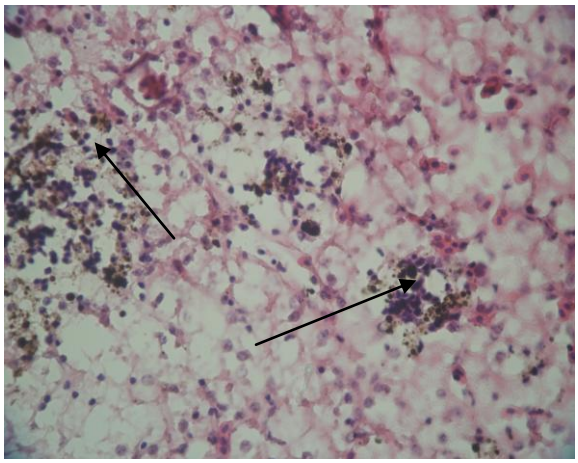
نگاره ۵–الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪. در نمونه‌های منفی فقط محصول PCR تکثیر شده از ژن ماهی در کنار مارکر 100bp قابل رویت است.



نگاره ٦ـ کانون‌های خونریزی و نکروز در بیماری پرسینیوزیس به همراه کلنی باکتریایی در کبد (H&E, 10x)



نگاره ۷ـ تصویر ضایعات هیستوپاتولوژی از نکروز در توبول‌های پروکسیمال کلیوی در بیماری پرسینیوز (H&E ,40x)



نگاره ۸ـ کلنی باکتریایی در طحال به همراه کانون‌های نکروتیک و تجمع هموسیدرین به رنگ سبز حنایی متمایل به زرد در بیماری پرسینیوز (H&E ,10x)

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمایشات هیستوپاتولوژی و PCR

نتایج	درصد PCR	در صد هیستوپاتولوژی	تعداد نمونه‌های مشکوک
مثبت	10٪	25٪	2 PCR 5 Histopathology
منفی	90٪	75٪	18 PCR 15 Histopathology
جمع	100٪	100٪	20 PCR 20 Histopathology

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان دهنده این مهم است که عامل یرسینیوز را می توان در استخر های تکثیر و پرورش ماهیان قزل‌آلای کشور یافت. شدت بروز بیماری به مقاومت ماهی، فاکتورهای استرس‌زا و محیطی مرتبط با فصل، تغییرات دما و PH است. افزایش سطح آگاهی در خصوص بهداشت مراکز پرورشی و قوانین امنیت زیستی، غربالگری و پایش جمعیت‌های ماهیان به منظور ایزولاسیون و قرنطینه ماهیان بیمار و ماهیان با رفتار های غیر طبیعی نقش به سزایی در محدود کردن سرعت یرسینیوز در ایران دارد. در حال حاضر بیماری یرسینیوزیس دارای پراکنش جهانی می‌باشد و به عنوان یک بیماری اندمیک در اکثر کشورهای تولید کننده ماهی قزل‌آلا پرورشی و سایر میزبانان طبیعی آن در زیستگاه‌های آبی به شمار می‌رود. برابر آمار انجمن ماهی قزل‌آلای بریتانیا ارزش سالانه خسارات حاصل از این بیماری به صنعت پرورش قزل‌آلا با احتساب هزینه‌های مربوط به تلفات، کاهش رشد، کاهش ضریب تبدیل خوراک، مصرف آنتی بیوتیک‌ها وتاخیر در برداشت ناشی از بروز بیماری، رقمی حدود۲۰٪ کل هزینه های تولید این صنعت می باشدباتوجه به اهمیت صنعت پرورش آبزیان بخش دام و کشاورزی کشور و از طرف دیگر به دلیل تعدد زیستگاه‌های طبیعی و مصنوعی آزاد ماهیان و میزبانان دیگر این بیماری از جمله تاس ماهیان، تشخیص قطعی بیماری حاصل ازعامل مولد یرسیینیوزیس در کارگاه‌های پرورش قزل‌آلای کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.امروزه با تکثیر DNA میکرو ارگانیسم و با استفاده از پرایمر اختصاصی آن می توان به تشخیص عامل مولد بیماری در نمونه‌های مشکوک دست یافت. باکتری‌ها دارای سکانس ژنی 16SrRNA اختصاصی هستند که درتوالی موجودات دیگر مشاهده نمی‌شود، همچنین هدف و رهیافت خوبی برای آزمایشات PCR نیز می‌باشد.

در هر دو روش آزمایشگاهی یاد شده، نمونه‌های مثبت از مصادیق عفونت یرسینیوزیس در کشور می باشد که مقایسه آنها در پایش و تشخیص پاتوژن در کشور بسیار مفید است. تفاوت در نتایج مثبت کسب شده بیانگر این است که اگرچه تکنیک PCR یکی از سریع‌ترین و حساس‌ترین روش‌های جایگزین تشخیصی در پایش یرسینیوزیس است اما بعضاً در تشخیص عوامل بیماری‌زا در بافت‌هایی که بدلایل مختلف سلول‌های آنها تجزیه و یا دچار نکروز شدید شده‌اند از کار آمدی کمتری برخوردار است، لذا روش پاتولوژی یکی از بهترین روش‌های تشخیصی برای نمونه‌های مرضی و تشخیص علائم پاتوگونومیک بوده، و در کنار روش‌های ملکولی بسیار سودمند می‌باشد. هر چند معرفی دو روش تشخیصی مهم و ارزشمند برای ردیابی عامل بیماری یرسینیوز در کشور با تکنیک‌های هیستوپاتولوژی و ملکولی، برای اولین بار ایده مناسب و کاربردی می‌باشد، ولی بررسی حدت عامل بیماری‌زا و پاتوژنیسیتی آن به همراه جداسازی باکتری یرسینیا راکری در مطالعات تکمیلی آتی بسیار مثمر ثمر خواهد بود.

فهرست منابع

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

2-Argenton, F., S. De Mas, C. Malocco, L. Dalla Valle and G. Giorgetti,(1996). Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of Yersinia ruckeri. Dis. Aquat. Organ., 24: 121-127.

3-Avci, H. and S.S. Birincioglu,(2005). Pathological findings in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) experimentally infected with Yersinia ruckeri. Turk. 1. Vet. Anim. Sci.,29: 1321-1328.
4-Boffy, S.A.,(1984). Agarose Gel Electrophoresis of DNA. In: Methods in Molecular Biology, Nucleic Acids, John Walker, M. (Ed.). Homana Press, USA, pp: 43-50.
5-Bullock, G.L., H.M. Stuckey and E.B. Shotts, (1978). Enteric red mouth bacterium: Comparison of isolates from different geographic areas. J. Fish Dis., 1: 351-356.
6-DelCerro, A, I. Marquez and .A Guijarro, (2002). Simultaneous detection ofAeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum and Yersinia ruckeri, three major fish pathogens, by multiplex PCR. Applied Environ. Microbiol., 68: 5177-5180.
7-Gibello, A, M.M. Blanco, M.A Moreno, M.T. Cutuli and A Domenech et al., (1999). Development of a PCR assay for detection of Yersinia ruckeri in tissues of inoculated and naturally infected trout. Applied Environ. Microbiol., 65: 346-350.
8-Haghighi.khiabanian Asl. A, sohrabi haghdoost .I(2008) Fish and Shrimp Pathology Book.Printed By, Faculty of Specialized Veterinary sciences,Islamic Azad University Science & Research Branch.P:76-78
9-Lejeune, JT. and FR. Rurangirwa, (2000). Polymerase chain reaction for definitive identification of Yersinia ruckeri. J. Vet. Diagn. Invest., 12: 558-561.
10-McPherson, M.J., S.G. Moller, R. Beynon and C. Howe, (2000). PCR: The Basics from Background to Bench. 1st Edn., BIOS Scientific Publishing Ltd., USA, P: 9-21.
11-Roberts ,R.J. (2001)Fish Pathology . Bailliere Tindall. London.chapter of bacterial disease.
12-Roozbahani ,M.R, Bandehpour, M, Haghighi.khiabanian Asl, Abdollahi, H, Kazemi, B. (2009) PCR-Based Detection of Yersinis ruckeri Infection in Rainbow Trout Fish. Asian J Anim. Vet. Adv., 4 (5): 258-262
13-Rucker, R., (1966). Red mouth disease of rainbow trout (Salmo gairdneri). Bull. Int. Epizoot.,65: 825-830.
14-Tobback, E., A Decostere, K. Hermans, F. Haesebrouck and K. Chiers, (2007). Yersinia ruckeri infections in salmonid fish. J. Fish. Dis., 30: 257-268.