مروری بر روش های تشخیصی بیماری های ویروسی میگو با تاکید بر بیماری لکه سفید

حسین هوشمند[1]، مینا آهنگرزاده[1]، سیدرضا سید مرتضایی[2]

Houshmand_h@yahoo.com

۱- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

چکیده

در بین ویروس های بیماری زای میگو، ویروس لکه سفید بیماری زاترین و ماندگارترین عامل ویروسی در بین عوامل بیماری زای میگو می باشد. براساس مطالعات صورت گرفته عفونت ناشی از این بیماری به دو صورت مشاهده می شود: در حالت اول که معمولاً حالت حاد نامیده می شود در طی دو هفته و در گونه های *P.indicus*، *P.monodon* و *P.pencillatus* گزارش گردیده است و در حالت دوم که به صورت مخفی و غالباً به عنوان حامل ویروس می باشد در گونه هایی شبیه خرچنگ‌ها، میگوی روزنبرگی و لابستـــرها مشاهده می شود که معمولاً هیچ علائمی از بیماری لکه سفید نیز نشان نمی دهند. روش‌های مختلفی جهت تشخیص بیماری های ویروسی گزارش گردیده است که از آن جمله روش PCR، روش Dot، In situ hybridization، ELISA و روش blot hybridization پاتولوژی می باشد. امروزه جهت تشخیص سریع بیماری های ویروسی کیت‌های تجاری مختلفی ساخته شده است که با روش PCR کار می کند و به صورت دو مرحله ای (Nested) می تواند در تشخیص سریع بیماری بسیار مؤثر و مفید واقع شود. در این مقاله سعی شده است که به صورت مختصر روش های مرسوم تشخیص بیماری های ویروسی میگو مخصوصاً بیماری لکه سفید مطرح و مقایسه بین هرکدام از روش ها صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: بیماری ویروسی لکه سفید، PCR، آسیب شناسی بافتی، روش های سرم شناسی

مقدمه

ویروس‌ها به عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای میگو مورد توجه هستند. مراحل مختلف زندگی میگوها ممکن است به عفونت ویروسی خاصی حساس باشد که سبب تلفات، رشد آهسته و بدشکلی‌های آناتومیکی شود. تا کنون بیش از ۲۰ ویروس بیماری‌زای میگوها گزارش شده است. بیماری لکه سفید یکی از مهلک ترین بیماری های ویروسی میگو در سطح جهان می باشد که با بروز آن در تابستان ۱۳۸۱ در ایران، کشور ما نیز همچون سایر کشورهای درگیر در پرورش میگو دچار عوارض این بیماری گردید و علاوه بر وارد آمدن ضررهای اقتصادی گسترده به این صنعت برخی از سایت های کشور را با تعطیلی مواجه نمود. در کنترل و پیشگیری از بیماری ها یکی از راه های مهم، تشخیص سریع و به موقع بیماری می باشد. انتخاب روش تشخیص بیماری به هدف بررسی، بستگی دارد. به عنوان مثال برای آزمایش مولدین و ناپلی‌ها در هچری‌ها روش‌های تشخیص متفاوتی در مقایسه با تحقیق بر روی بیماری‌زایی ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین روش شامل علائم بالینی، مشاهده با میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ فاز کنتراست، میکروسکوپ زمینه تیره، سنجش بیولوژیک[1]، میکروسکوپ الکترونی، روش های سرم شناسی، روش های مولکولی و هیستوپاتولوژیک برای تشخیص عفونت ویروسی توسعه یافته اند. روش‌های هیستوپاتولوژی، سرم شناسی و مولکولی از جمله روش های مرسومی هستند که در زمینه

1. Bioassay

بیماری لکه سفید یکی از مهلک‌ترین بیماری های ویروسی میگو در سطح جهان می باشد که با بروز آن در تابستان ۱۳۸۱ در ایران، کشور ما نیز همچون سایر کشورهای درگیر در پرورش میگو دچار عوارض این بیماری گردید.

تشخیص بیماری های ویروسی در میگو بیشتر مورد استفاه قرار می گیرند. در این نوشتار سعی شده است روش های مرسوم برای تشخیص بیماری های ویروسی با اهداف کاربردی و مقایسه کمی و کیفی آن ها بررسی گردیده و خلاصه ای برای تکنسین ها و کارشناسان آزمایشگاه ها فراهم گردد.

۱- روش هیستوپاتولوژی

در مراحل اولیه، بیماری لکه سفید با سلول‌هایی با هسته های هیپرتروفی شده و گنجیدگی‌هایی داخل هسته‌ای[1] از نوع Cowdry type A (که به وسیله کروماتین به حاشیه رانده شده و جدا شده از نوکلئوپلاسم مشخص می شود) شناخته می شود. این گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای به طور محسوسی مشخص بوده و بزرگ تر از گنجیدگی‌های پدید آمده در بیماری IHHNV هستند. هسته‌های آلوده بازوفیلی و متسع می‌شوند. ممکن است در مراحل پایانی عفونت شکسته شدن هسته و پارگی سلول رخ بدهد که منجر به تشکیل نقاط نکروزه‌ای می‌شود که مشخصه آن واکوئله شدن بافت است (Lightner, 1996). اگر چه که این روش به عنوان آزمایش طلایی در تشخیص بیماری های ویروسی مورد استفاده قرار می گیرد اما از حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به روش مولکولی و سرم شناسی برخوردار بوده و نیاز به افراد متخصص و با تجربه دارد، همچنین مدت زمان لازم برای ارائه پاسخ بیش از سایر روش های تشخیصی می باشد.

۲- روش‌های سرم شناسی

اصول کلی این روش ها استفاده از آنتی بادی های مخصوص برای تعیین آنتی ژن های خاصی می باشد که معمولاً از اجزای ساختاری عوامل بیماری زا بوده و یا پروتئین های تولید شده توسط عامل بیماری زا می باشند. در روش های سرم شناسی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی کلونال تولید شده در برابر آنتی‌ژن ویروس یا آنتی‌ژن‌های نوترکیب ویروس برای ردیابی آنتی ژن در مایعات خونی و لنفی موجود زنده استفاده می شود (Escobedo-Bonilla et al., 2007).

این روش‌ها برای تأیید تشخیص عفونت و مشاهده سلول‌های آلوده و یا اندازه‌گیری کمی آنتی‌ژن‌های ویروسی می‌باشد که بالقوه سریع، حساس و قابل اجرا برای تعدادی از نمونه ها در موقعیت هایی با حداقل امکانات آزمایشگاهی و یا مزارع می باشد. روش‌های سرم شناسی به بیان آنتی‌ژن‌های ویروسی و اختصاصیت آنتی بادی تولید شده در برابر آنتی‌ژن‌های ویروسی بستگی داشته و همچنین به دلیل معمول نبودن این روش ها در میگو بستگی به ساخت آنتی بادی و اختصاصیت آن در برابر یک آنتی ژن ویژه و یا کل ویروس هزینه انجام آن متفاوت خواهد بود. این روش ها در حال حاضر به شکل تحقیقاتی و صرفاً آزمایشگاهی در برخی از دانشگاه های کشور انجام شده است.

۳- روش‌های مولکولی

۳-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

واکنش زنجیره ای پلیمر از روشی است که در آن مقادیر کمی از DNA هدف، تکثیر می شود. این روش با به کار بردن پرایمرهای مخصوصی که برای ردیف و توالی خاصی از DNA طراحی شده است، انجام می گیرد. به منظور نتیجه گیری بهتر، غیر از PCR معمولی روش های جدیدی از PCR ارائه شده است، شامل:

- PCR تک مرحله‌ای

ویروس لکه سفید را در میگوهایی که دارای تراکم قابل توجهی از DNA ویروس هستند تشخیص می‌دهد که معمولاً در این حالت ممکن است میگوها علایم بیماری را نشان ندهند (Jian et al., 2005).

- نستد – پی سی آر (Nested-PCR)

در این روش به منظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می شود. ابتدا با یک جفت پرایمر اول در طول ۳۰-۱۵ چرخه، قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می یابند، سپس محصول PCR حاصل به لوله دیگری منتقل شده و به عنوان الگو استفاده می شود و به وسیله جفت پرایمرهای دوم، مرحله دوم PCR انجام می شود. این روش می‌تواند عفونت‌های خفیف را در مولدین، ناپلی، پست

در روش های سرم شناسی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کلونال تولید شده در برابر آنتی‌ژن ویروس یا آنتی‌ژن‌های نوترکیب ویروس برای ردیابی آنتی ژن در مایعات خونی و لنفی موجود زنده استفاده می شود.

1. Inclusion bodies

لارو و میگوهای جوان تشخیص دهد.

- مالتیپلکس – پی سی آر(Multiplex-PCR)
در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می شود. با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه به طور همزمان وجود دارد و می توان عفونت های مخلوط را تشخیص داد. به عنوان مثال تشخیص همزمان ویروس لکه سفید و دیگر ویروس‌ها مثل ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز، ویروس سندرم تورا و مونودون باکلوویروس و یا دو ویروس نکروز عفونی بافت زیرجلدی و خونساز و ویروس سندرم تورا با این روش امکان پذیر است (Xie et al, 2007). در این روش بیش از یک سکانس هدف توسط بیش از یک جفت پرایمر تکثیر می گردد در نتیجه بخش های بزرگی از یک DNA هدف، جهت جستجوی تغییرات می تواند بررسی شود.
معایب روش PCR شامل تشخیص اشتباه (مثبت کاذب)، عدم توانایی این روش در اثبات عفونی بودن DNA شناسایی شده، وابستگی حساسیت آزمایش به پرایمر طراحی شده، نقص در جایابی ویروس در بافت‌ها و امکان حضور ممانعت کننده‌ها در برخی بافت ها (منفی کاذب) می‌باشد (Shekhar et al., 2006؛ Sritunyalucksana et al., 2006).

۳-۲- روش In situ hybridization
روشی برای تعیین موقعیت و ردیابی توالی های خاص mRNA و DNA در مقاطع بافت های تثبیت شده از طریق هیبرید کردن رشته مکمل یک نوکلئوتید نشانگر به ترادف مورد نظر است. در این روش DNA ویروس در بافت میزبان به وسیله هیبریدیزاسیون با پروب DNA تشخیص داده می شود و برای تشخیص سلول‌های آلوده در بافت مفید است اما نسبت به PCR از حساسیت کمتری برخوردار است و نیاز به تجهیزات هیستوپاتولوژی دارد (Chang et al., 1996؛ Wongteerasupaya et al., 1996).

۳-۳- روش Dot blot hybridization
دراین روش بایستی RNA یا DNA را جداسازی کرده و در روی ژل تفکیک نمود، سپس بر روی غشای نیتروسلولز لکه گذاری شده و با ترادف مکمل آن پروب کردن صورت می گیرد، در واقع قطعه ای از DNA ویروس به وسیله هیبریدیزاسیون با پروب DNA تشخیص داده می شود. این روش هم در مقایسه با PCR از حساسیت کمتری برخوردار است (Shekhar et al., 2006).
روش In situ hybridization مشابه روش های معمول هیبریداسیون است ولی در این روش از پروبی استفاده می شود که ترادف های خاص نوکلئوتیدی را در داخل سلول ها و بافت ها ردیابی می کند. همچنین ویژگی های مورفولوژیکی بافت حفظ می شود. حساسیت این روش به میزانی است که بتواند ۲۰-۱۰ کپی mRNA را در هر سلول تشخیص دهد.

نتیجه گیری
عفونت‌های ویروسی در بافت هدف به وسیله PCR یک مرحله‌ای، ۱۲ ساعت پس از تلقیح ویروس، با روش هیستوپاتولوژی ۳۶ ساعت، با روش سرم شناسی ۱۲ ساعت، با روش In situ hybridization ۱۶ ساعت و ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس با روش وسترن بلات تشخیص داده می‌شود (Escobedo-Bonilla et al, 2007). با توجه به موارد ذکر شده برای رعایت سرعت و دقت در تشخیص می توان از روش PCR دو مرحله ای استفاده نمود که هم سریع و دقیق است و هم نسبت به روش های دیگر از پیچیدگی کمتر و هزینه پایین تری برخوردار است، اما به دلیل این که در روش مولکولی شناسایی ژنوم ویروس لزوماً عفونی زا بودن آن را تأیید نمی نماید بایستی در کنار این روش از بررسی علایم بالینی و تأیید تشخیص با آزمایش هیستوپاتولوژی بهره برد.

فهرست منابع
1. Chang, P.S., Lo C.F., Wang Y.C. & Kou, G.H. (1996). Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases in Aquatic Organisms, 27, 131–139.

به دلیل این که در روش مولکولی شناسایی ژنوم ویروس لزوماً عفونی زا بودن آن را تأیید نمی نماید بایستی در کنار این روش از بررسی علایم بالینی و تأیید تشخیص با آزمایش هیستوپاتولوژی بهره برد.

1. Carrying capacity

2. Durand, S.V, Lightner, D.V., (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Fish Diseases, 25, 381- 389.
3. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., (2007). Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 74, 85- 94.
4. Jian, X-F., Lu, L., Chen, Y-G., Chan, S-M., He, J-G., (2005). Comparison of a novel in situ polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei*. Diseases in Aquatic Organisms, 67, 171- 176.
5. Lightner, D.V., (1996). A Hand Book of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.
6. Shekhar, M.S., Azad, I.S., and Ravichandran, P., (2006). Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. Aquaculture, 261, 1122- 1127.
7. Sritunyalucksana, K., Apisawetakan, S., Boon-nat, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., (2006). A new RNA virus found in black tiger shrimp *Penaeus monodon* from Thailand. Virus Research, 118, 31- 38.
8. Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W., (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture, 143, 23- 32.
9. Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J., Lu, Z., Khan, M.I., (2007). A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. Diseases in Aquatic Organisms, 76, 77- 80.