دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و چهارم، شماره ۵، صفحه ۴۸۰-۴۶۹ (آذر و دی ۱۴۰۰)

Iran South Med J 2021; 24(5): 469-480

طراحی و ارزیابی عملکرد PCR جهت تشخیص ویروس سندروم لکه سفید در میگو

حسین معین (MS)[1*]، فرشید کفیل‌زاده (PhD)[1**]، محمدرضا میری (PhD)[2]، محمد خلیل‌پذیر (PhD)[3]

[1] گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
[2] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[3] پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۹- پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۷/۱۹)

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

چکیده

زمینه: ویروس سندروم لکه سفید، عامل بیماری لکه سفید در میگوها و بسیاری از سخت‌پوستان می‌باشد. این بیماری بسیار مسری است و در طی ۱۰-۳ روز در شرایط کشت طبیعی باعث مرگ‌و میر می‌شود، بنابراین، تشخیص زود هنگام این ویروس یک ضرورت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای ۳ ناحیه از ژنوم ویروس و یک ناحیه از ژنوم میگو پرایمرهایی سازگار با هم طراحی شدند که بتوانند با هم در یک واکنش عملکرد داشته باشند.استخراج DNA از ۴۰ نمونه میگوی مشکوک به بیماری انجام گردید. سپس پرایمرها به صورت تکی جهت تشخیص ویروس لکه سفید بهینه‌سازی شدند و پس از انتخاب مناسب‌ترین آن‌ها، تشخبص ویروس به صورت همزمان توسط دو جفت پرایمر انجام گردید. از پرایمرهای تکثیر کننده ژنوم میگو هم به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

یافته‌ها: از بین پرایمرهای طراحی شده ۳ جفت پرایمر که یک قطعه از ژنوم میگو و ۲ قطعه از ژنوم ویروس را تکثیر می‌کردند انتخاب گردید. از ۴۰ نمونه بررسی شده ۲۸ نمونه مثبت (آلوده به ویروس) و ۱۲ نمونه منفی بود که با نتایج به‌دست آمده با کیت مرجع مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: جهت تشخیص ویروس، بررسی ۲ ناحیه از ژنوم آن کافی می‌باشد و احتمال منفی کاذب را کاهش می‌دهد. همچنین استفاده از ژنوم میگو جهت کنترل مراحل استخراج DNA و PCR مفید می‌باشد. روش PCR تک مرحله‌ای نسبت به روش‌های دو مرحله‌ای (Nested PCR) بدلیل کاهش احتمال آلودگی و راحتی انجام آن اولویت دارد.

واژگان کلیدی: ویروس، سندروم لکه سفید، PCR، تشخیص

**جهرم، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

Email: f.kafilzadeh@gmail.com
***ORCID: 0000-0002-2240-217X**
****ORCID: 0000-0003-2506-7140**

مقدمه

ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) عامل بیماری لکه سفید (WSD) در میگوها و بسیاری از سخت پوستان می‌باشد (۳-۱). ویروس سندروم لکه سفید از DNA دو رشته‌ای (۴) حلقوی و بسیار پیچ خورده با ۱۸۰ قالب خواندن جفت باز (Open Reading Frames) و ۹ منطقه از توالی‌های تکراری پشت سر هم (repeated sequences in tandem) (۵) تشکیل شده است که ژنوم بسته به نحوه جدا شدن طول ۳۰۰ تا ۳۰۵ کیلو جفت باز برای آن گزارش شده است (۸-۶). با این حال، طول‌های متفاوتی از DNA نظیر ۳۱۲-۲۸۱ کیلو جفت باز نیز توسط دیگر دانشمندان (۹) گزارش شده است. WSSV بسیار مسری است و قادر است در طی ۱۰-۳ روز در شرایط کشت طبیعی باعث مرگ ومیر صد در صد شود (۲ و ۱۰).

عفونت WSSV در میگو را می‌توان از طریق لکه‌های سفید مشخص ایجاد شده در پوسته خارجی تشخیص داد (۱۱ و ۱۲). با این حال، این علامت بالینی مدت‌ها پس از آلودگی در زمانی که حیوان در آستانه مرگ است، قابل رؤیت می‌شود و ممکن است لکه‌های سفید در همه نمونه‌های آلوده به عفونت‌ها ایجاد نشوند (۱۳). بنابراین روش‌های تشخیص در گذشته از روش‌های شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (EM) تا روش‌های ایمنی و مولکولی بسیار حساس که می‌توانند ویروس را حتی در ناقل‌های بدون علامت تشخیص دهند، تکامل یافته‌اند (۲).

از زمان اولین گزارش وقوع این بیماری در چین و تایوان بین سال‌های ۱۹۹۱ و ۱۹۹۲، همواره WSSV خسارات اقتصادی زیادی در صنعت تولید میگو در بسیاری از کشورها وارد کرده‌است (۱۰، ۱۸-۱۴). در سطح جهان، خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری به صنعت میگو از زمان ظهور تا سال ۲۰۱۲ حدود ۸-۱۵ میلیارد دلار تخمین زده شده است (۱۹). ضررهای اقتصادی بر اساس محاسبات انجام گرفته سالانه ۱ میلیارد دلار افزایش یافته بود (۳ و ۲۰). چندین نویسنده اظهار کرده‌اند که ضررهای اقتصادی سالانه ناشی از WSSV به‌طور متعارف تقریباً با یک دهم تولید جهانی میگو برابری می‌کند (۲۰). بنابراین، WSD منجر به تولید فضای ناامن در صنایع میگو مانند مزارع، صنایع تولید خوراک، کارخانه‌های فرآوری و کارگاه تکثیر و در نهایت افزایش مشکلات بیکاری در سراسر جهان می‌شود (۲۱). WSD از سال ۱۹۹۱ به ایجاد خسارات در مزارع پرورش میگو در سراسر جهان ادامه می‌دهد (۱، ۱۵، ۲۱-۲۳)، اما همچنان با وجود تلاش‌های فراوان بیماری در سطح مزرعه کنترل نشده است (۱۶ و ۱۷). با توجه به اهمیت کنترل WSD، سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE)، این بیماری را در لیست اولویت‌بندی شده خود قرار داده است (۲۴).

ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) بر تمام بافت‌های اکتودرمال و مزودرم تأثیر می‌گذارد (۱۴). چندین مطالعه نشان داده است که عفونت‌های WSSV در بافت‌های مختلف از جمله همولنف، آبشش، معده، اپیتلیوم کوتیکولار بدن، بافت‌های خونساز، اندام لنفاوی، غدد آنتن، بیضه‌ها و تخمدان‌های میگوی آلوده طبیعی و تجربی قابل تشخیص است (۱۳، ۲۵ و ۲۶). علاوه بر این، گزارش شده است که آبشش‌ها، معده، اپیتلیوم کوتیکول بدن، بافت‌های خون ساز، اندام لنفاوی و غدد آنتن اصلی‌ترین بافت هدف برای تکثیر WSSV هستند (۲۶-۲۸) که در طی مرحله انتهایی عفونت WSSV

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

تخریب می‌شوند (۲۹ و ۳۰). یک مطالعه تجربی نشان داد که پس از ۶ ساعت عفونت، WSSV از طریق ایجاد تغییرات متابولیکی موجب خنثی‌سازی سیستم دفاعی استرس اکسیداتیو میزبان می‌شود (۳۱).

WSD مانند بسیاری از بیماری‌های ویروسی دیگر قابل درمان نیست و بنابراین، حذف سریع ویروس از مکان‌های پرورش میگو توصیه می‌شود (۳۲ و ۳۳). دستورالعمل‌های امنیتی زیستی متعددی منتشر شده است که از جمله آن‌ها اثرات فیلتر و ضدعفونی کردن آب ورودی، تولید مولدهای خاص بدون پاتوژن، سیستم‌های تعویض آب کم و خشک شدن کامل واحدهای کشت پس از هر چرخه کشت، استفاده از حصار جهت جلوگیری از ورود خرچنگ، جلوگیری از ورود پرندگان، ایجاد حوضچه‌هایی جهت ضدعفونی کفش و کاهش دسترسی به امکانات مرتبط با میگو از روش‌های معمول در حذف عوامل بیماری‌زا در اکثر مزارع پرورش میگو می‌باشد (۲۳).

پس از انتشار توالی کامل ژنوم WSSV (۶ و ۳۴) از تکنیک مولکولی PCR به‌عنوان حساس‌ترین روش تشخیصی جهت تشخیص WSSV استفاده شده است.در این روش‌های وابسته به PCR، از آغازگرها استفاده می‌شود (۲۷).

با توجه به اینکه درمانی برای این بیماری در میگوها وجود ندارد نیاز به روش‌های تشخیصی سریع و دقیق جهت تشخیص زود هنگام و حذف این ویروس از محیط کشت ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه، طراحی و ارزیابی عملکرد PCR جهت تشخیص ویروس لکه سفید در میگو می‌باشد که پس از بهینه‌سازی بر روی نمونه‌های میگو عملکرد آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

۴۰ نمونه میگو مورد نیاز از سه مزرعه مختلف پرورش میگو با فواصل ۴۰ کیلومتر انتخاب شدند و در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه حمل شده و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگه‌داری شدند. کسب نتیجه مطلوب منوط به تهیه DNA با کیفیت خوب و عاری از هرگونه آلودگی بود.

استخراج DNA

پس از آماده سازی نمونه‌ها و شماره‌گذاری آن‌ها مرحله استخراج انجام گرفت. برای مرحله استخراج از کیت استخراج DNA شرکت تریتاژن (ایران) استفاده شد. برای این مرحله در ابتدا ۴۰ میلی‌گرم از بافت‌های مختلف میگو نظیر بافت نرم و قسمت‌های سخت که شامل دم، پوست و پاهای آبششی با تیغه‌های جراحی استریل شده جدا شدند تا از آلودگی متقاطع جلوگیری شود و در یک لوله میکرو سانتریفیوژ استریل ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت.به‌طور خلاصه: بافت جدا شده پس از اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر بافر لایز کننده کوبیده شد تا با بافر لایز کننده به خوبی مخلوط شود. پس از این مرحله ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل را برداشته و در یک میکروتیوب دیگر ریخته و سپس ۶۰۰ میکرولیتر از بافر BB (Bindig Buffer) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر اتانول خالص (۱۰۰-۹۶ درصد) به میکروتیوب اضافه و مجموعه به ستون استخراج منتقل شد و یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. پس از مرحله اول سانتریفیوژ ۶۰۰ ماکرولیتر از محلول WB1

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

(Wash Buffer 1) را به ستون اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ تکرار شد. پس از اتمام سانتریفیوژ و خالی کردن محتویات تیوب collection میزان ۶۰۰ ماکرولیتر از محلول WB2 (Wash Buffer 2) به ستون اضافه و مجدداً با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ تکرار گردید. در نهایت پس از انتقال ستون به یک میکروتیوب تمیز ۵۰ ماکرولیتر بافر EL (Ellusion) به ستون اضافه و پس از ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، با دور ۱۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید. DNA بدست آمده در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

به منظور حصول اطمینان از کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، جذب DNA توسط دستگاه نانودراپ (Denovix DS-11) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

انتخاب و ترکیب پرایمر

به منظور طراحی مناسب PCR جهت تشخیص WSSV، ژنوم میگو (IDs: 2106361 [UID] 7871408 [RefSeq] 8054448 [GenBank]) و ویروس (IDs: 6305188 [UID] 6305188 [GenBank]) مورد بررسی قرار گرفت و سرانجام پرایمرهایی با نرم افزار primer3 طراحی گردید که قطعات با طول‌های ۷۵۴ جفت باز از ژن ۱۸s ریبوزومال میگو به‌عنوان کنترل داخلی و پرایمرهای مختص ژنوم ویروس با توانایی تکثیر قطعاتی با طول ۱۹۲، ۳۰۲ و ۵۵۳ جفت باز از نواحی مرتبط با ژن پروتئین کیناز ۱ و ژن پروتئین VP28 را تکثیر می‌نمایند.

بررسی عملکرد پرایمرها

پس از طراحی اولیه پرایمرها برای قطعات مختلف ژنوم ویروس و میگو، عملکرد پرایمرها به صورت جداگانه بررسی شد. همچنین عملکرد ترکیب پرایمرها به صورت استفاده همزمان از قطعه ۷۵۴ جفت باز از میگو به‌عنوان کنترل داخلی به همراه قطعات ۵۵۳، ۳۰۲ و ۱۹۲ جفت باز از ویروس انجام شد، همچنین ۴ حالت مالتیپلکس با قطعات میگو و ویروس به صورت ۷۵۴، ۵۵۳، ۳۰۲، ۱۹۲ و ۷۵۴، ۵۵۳، ۳۰۲ و ۷۵۴، ۵۵۳، ۱۹۲ و ۷۵۴، ۳۰۲، ۱۹۲ جفت باز (bp) بررسی گردید.

بهینه‌سازی PCR

بعد از انتخاب بهترین ترکیب پرایمری جهت تشخیص WSSV در میگو، بهینه‌سازی آن‌ها انجام شد، بدین‌صورت که در ابتدا غلظت‌های مختلفی از DNA استخراج شده از ۳۰۰-۱۰ نانوگرم استفاده شد تا بهترین محدوده مقدار DNA انتخاب گردد. همچنین تعداد سیکل‌های PCR و دمای اتصال پرایمرها در حالت multiplex بهینه سازی گردید.

بررسی عملکرد PCR انتخاب شده بر روی نمونه‌های میگو

پس از بهینه‌سازی، به منظور بررسی عملکرد آن، تعداد ۱۰ نمونه بیمار و ۳۰ نمونه سالم که قبلاً با کیت تشخیصی IQ2000 (GeneReach Biotechnology corp.) تأیید شده بودند انتخاب و به صورت دو سو کور تست گردید.پس از انجام PCR جهت بررسی نتایج حاصله، الکتروفورز انجام شد.

یافته‌ها

استخراج DNA: DNA استخراج شده از ۴۰ نمونه میگو (جدول ۱) به‌طور میانگین دارای غلظتی معادل ۹۰/۲۲ نانوگرم، جذب ۲۶۰/۲۸۰ معادل ۱/۹۶ و ۲۶۰/۲۳۰ معادل ۱/۲۲ بودند.

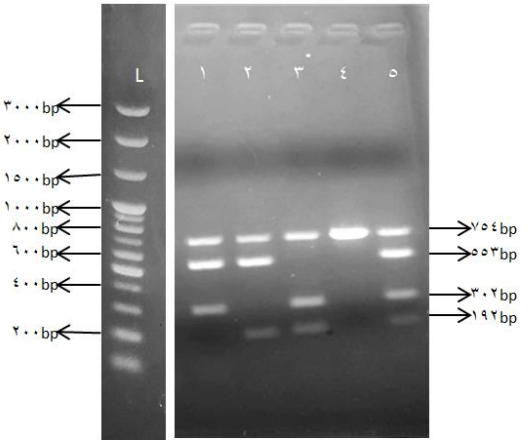
[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

جدول ۱) بررسی کیفیت DNA استخراج شده

نمونه	غلظت DNA (نانوگرم)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰	نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰
۱	۱۷۷	۱/۹۹	۱/۹۶
۲	۲۰۰	۲	۲/۱۵
۳	۱۵۶	۲	۱/۹۹
۴	۱۶۱	۱/۹۵	۲
۵	۵۶	۱/۷۳	۰/۹
۶	۳۳	۱/۷	۰/۸
۷	۳۶	۱/۹۲	۱/۵
۸	۱۸	۱/۵۷	۰/۷
۹	۵۰	۱/۸۲	۱/۴
۱۰	۷۱	۱/۸۲	۱/۷۱
۱۱	۱۰۹	۱/۸۹	۲
۱۲	۲۷۹	۱/۸۹	۱/۸۳
۱۳	۲۰	۱/۹۲	۱/۵۳
۱۴	۱۱	۱/۸۴	۱/۸
۱۵	۲۹۸	۲/۳	۲/۰۳
۱۶	۸۶	۲	۱/۲۷
۱۷	۸۳	۲/۱	۰/۲
۱۸	۱۵	۱/۷۹	۱/۵
۱۹	۷۳	۲	۱/۲۷
۲۰	۱۲۳	۲/۱	۰/۴
۲۱	۶۸	۲	۰/۴
۲۲	۴۴	۲	۰/۷
۲۳	۳۲	۲/۵	۱/۲
۲۴	۵۹	۱/۹۸	۰/۷۲
۲۵	۱۱۴	۲	۰/۴۵
۲۶	۱۰۰	۱/۹	۱/۱۷
۲۷	۲۶	۱/۹	۰/۸
۲۸	۲۹۷	۲/۱	۱/۴
۲۹	۵۳	۱/۹۷	۱/۷۱
۳۰	۱۴۵	۲/۱۴	۲
۳۱	۴۳	۱/۹۸	۱/۸۳
۳۲	۱۰	۱/۸۲	۱/۵۳
۳۳	۱۸۷	۲/۱	۱/۵۳
۳۴	۹۲	۲/۱	۱/۵
۳۵	۲۲	۱/۹۹	۰/۸
۳۶	۴۴	۱/۸۷	۰/۸۵
۳۷	۴۷	۲	۰/۴
۳۸	۷۵	۲	۱/۲۶
۳۹	۶۴	۱/۹	۱/۱
۴۰	۳۲	۱/۸۸	۱/۵
میانگین	۹۰/۲۲۵	۱/۹۶	۱/۲۹

بررسی عملکرد پرایمرها

۴ جفت پرایمر طراحی شده که یک جفت مربوط به DNA میگو که به‌عنوان کنترل داخلی و قطعه ۷۵۴ جفت باز را تکثیر می‌کند و ۳ جفت دیگر مربوط به DNA ویروس می‌باشد و قطعات ۱۹۲، ۳۰۲ و ۵۵۳ جفت باز را تکثیر می‌کنند به صورت جداگانه و ترکیب‌های ۳ تایی و ۴ تایی بررسی شد و نتایج حاصل از انجام PCR بر روی ژل آگارز بررسی گردید که نتایج حاصل در شکل ۱ مشاهده می‌گردد.



شکل ۱) نتایج حاصل از الکتروفورز ترکیبات مختلف پرایمرها: L) مارکر DNA، ۱) ترکیب پرایمرهای ۷۵۴،۵۵۳ و ۳۰۲ جفت باز، ۲) ترکیب پرایمرهای ۷۵۴،۵۵۳ و ۱۹۲ جفت باز، ۳) ترکیب پرایمرهای ۷۵۴،۳۹۲ و ۱۹۲ جفت باز، ۴) پرایمر ۷۵۴ جفت باز، ۵) ترکیب پرایمرهای ۷۵۴، ۵۵۳، ۳۰۲ و ۱۹۲ جفت باز

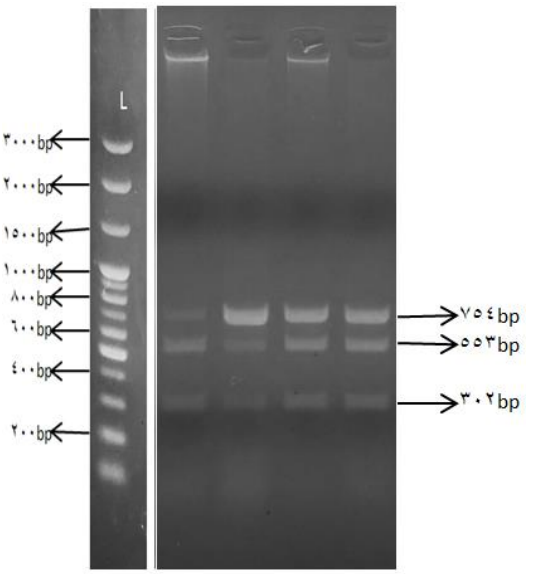
Fig 1) Results of electrophoresis of different compositions of primers:L) DNA marker, 1) Combination of primers 754, 553 and 302 base, 2) Combination of primers 754, 553 and 192 base, 3) Combination of primers 754, 392 and 192 base, 4) Primer 754 base, 5) Combination of 754 primers, 553, 302 and 192 open

بهینه‌سازی مقدار DNA

غلظت‌های متفاوت DNA در محدوده ۳۰۰-۱۰ نانوگرم در ماکرولیتر (جدول ۱) جهت دستیابی به بهترین عملکرد به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که پرایمر طراحی شده در محدوده

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

غلظت‌های ۴۵ نانوگرم به بالا (شکل ۲) قادر به انجام صحیح تکثیر بوده و بهترین جواب در غلظت ۱۵۰ نانوگرم مشاهده شد.

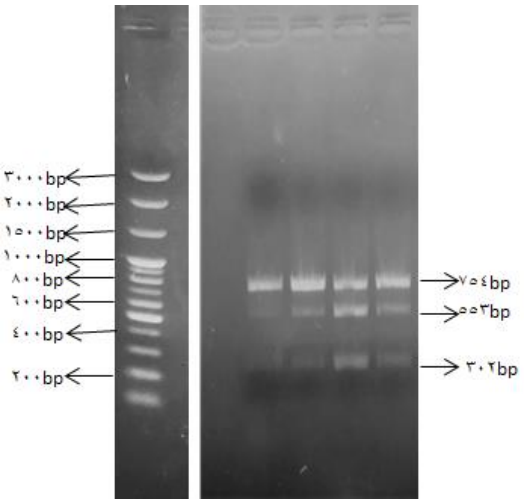


شکل ۲) نتایج حاصل از الکتروفورز مقادیر مختلف DNA مورد استفاده جهت الگو: L) مارکر DNA، ۱) غلظت ۴۵ نانوگرم ۲) غلظت ۷۵ نانوگرم ۳) غلظت ۱۵۰ نانوگرم ۴) غلظت ۳۰۰ نانوگرم

Fig 2) Results from electrophoresis of different amounts of DNA used for the pattern: L) DNA marker, 1) Concentration of 45 ng, 2) Concentration of 75 ng, 3) Concentration of 150 ng, 4) Concentration of 300 ng

بهینه‌سازی پروتکل PCR

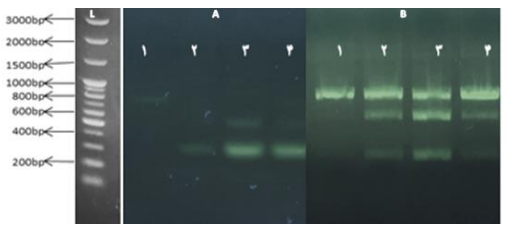
جهت بهینه کردن شرایط PCR، دمای اتصال ۵۶، ۵۷ و ۵۸ درجه و تعداد سیکل بین ۳۰، ۳۳ و ۳۵ بررسی گردید (شکل ۳) و در نهایت بهترین پروتکل با مرحله آغازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه و ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و مرحله پایانی ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انتخاب شد.



شکل ۳) نتایج الکتروفورز حاصل از تعداد سیکل‌های متفاوت جهت انجام PCR: L) مارکر DNA، ۱) ۳۰ سیکل، ۲) ۳۳ سیکل، ۳) ۳۵ سیکل ۴) ۳۷ سیکل

Fig 3) Electrophoresis results from different cycles for PCR: L) DNA marker, 1) 30 cycles, 2) 33 cycles, 3) 35 cycles, 4) 37 cycles

نتایج بررسی عملکرد PCR بر روی نمونه‌های میگو: نتایج به‌دست آمده از تست ۴۰ نمونه با PCR طراحی شده و کیت IQ2000 (شکل ۴) نشان داد که در تمام موارد نمونه‌های بیمار و سالم به درستی تشخیص داده شده‌اند.



شکل ۴) مقایسه نتایج حاصل از PCR نمونه‌ها توسط دو روش کیت IQ2000 (A) و روش Multiplex PCR تک مرحله‌ای (B): L) مارکر DNA، ۱) نمونه منفی، ۲) نمونه مثبت، ۳) نمونه مثبت، ۴) نمونه مثبت

Fig 4) Comparison of PCR results of samples by two methods of IQ2000 kit (A) and Multiplex PCR method (B): L) DNA marker, 1) negative sample, 2) positive sample, 3) positive sample, 4) sample Positive

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

۴۰ نمونه آزمایش شده دقیقاً نتایجی مشابه با کیت IQ2000 نشان داد پرایمرهای طراحی شده دقت و حساسیتی معادل ۱۰۰ درصد در مقایسه با کیت مورد استفاده در آزمایشگاه‌های ایران را دارا می‌باشد.

بحث

از گذشته روش‌های شناسایی مختلفی برای ویروس WSSD مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از روش‌های تشخیص با استفاده از علائم ظاهری می‌باشد که به دلیل ظهور در مراحل پایانی بیماری و شباهت با بیماری‌های ویروسی دیگر کار دشواری می‌باشد (۱۳). میکروسکوپ الکترونی (EM) به‌عنوان اولین تکنیک برای شناسایی ویروس‌ها استفاده می‌شود (۳۵)، اما برخی از موارد مانند هزینه، دشواری‌های تشخیص تمایز بین ویروس‌های مشابه و توان عملیاتی کم (low throughput) از موانع استفاده از EM به‌صورت گسترده محسوب می‌شوند (۳۶).

با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال خاص (MAbs) می‌توان WSSV را در میگوها با استفاده از وسترن بلات، لکه‌گذاری نقطه‌ای (dot blotting) (روش پروتئین شناخته شده مبتنی بر آنتی‌بادی) و ایمونوهیستوشیمی‌تشخیص داد و از واکنش متقابل سایر پروتئین‌های ویروسی یا میگو جلوگیری کرد (۳۷-۳۹)، حساسیت تشخیصی بالا (۱۰۰ درصد)، این روش‌های ایمنی را نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تک مرحله‌ای (PCR) ارجح می‌کند، اما به دلیل نیاز به بارهای ویروسی بالا برای شناسایی و تشخیص در مراحل اولیه بیماری مناسب نمی‌باشد (۴۰). ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مبتنی بر آنتی‌بادی روش دیگری است که به‌طور معمول در مطالعات ویروس‌شناسی استفاده می‌شود، اگرچه این روش خاص است اما حساسیت کمتری دارد. در یک آزمایش، حساسیت و ویژگی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به‌ترتیب ۲۹ و ۹۶ درصد در مقایسه با PCR عنوان شد (۴۱). تکنیک ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نیز به تراکم نسبتاً زیاد ذرات ویروس در بافت میزبان نیاز دارد، بنابراین تشخیص ویروس در مراحل اولیه عفونت امکان‌پذیر نیست (۴۲). علیرغم مزایای فراوان روش‌های تشخیص ایمنی WSSV مثل حساسیت، اختصاصیت و دقت بالا (۳۸ و ۴۳)، این تکنیک‌ها پرهزینه و زمان‌بر هستند و نیاز به تجهیزات ویژه و پرسنل ماهر دارند که منجر به عدم استفاده آن‌ها به صورت گسترده می‌شود (۴۳).

از دیگر روش‌های تشخیص، روش مولکولی است که انواع مختلفی دارد.از جمله آن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که بر پایه طراحی پرایمر می‌باشد که شامل پی سی آر تک مرحله‌ای (One step PCR)، پی سی آر سمی‌نستد (Semi nested PCR)، پی سی آر دو مرحله‌ای (Two step PCR)، پی سی آر رقابتی کمی (Quantitiative competitive PCR)، پی سی آر ریل تایم (Real time PCR)(RT-PCR) می‌باشد و موفقیت این روش‌ها در تشخیص به میزان حساسیت پرایمر طراحی شده بستگی دارد (۲۴، ۴۶-۴۴).

با توجه به مزایای PCR تک مرحله‌ای نظیر صرفه‌جویی در هزینه و زمان بر آن شدیم تا با طراحی پرایمر با حساسیت و دقت بالا به روشی سریع برای تشخیص و شناسایی زود هنگام ویروس در مراحل اولیه آلودگی دست یابیم.

در این مطالعه مقدار غلظت DNA استخراج شده از ۴۰ میلی‌گرم بافت (۴۷) به‌طور میانگین ۹۰/۲۲ نانوگرم با نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ متوسط ۱/۹۹ و ۱/۲۹=۲۶۰/۲۳۰ می‌باشد که در مقایسه با مطالعه‌ای که توسط مینگ

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

ژو(Ming Xue) و همکاران بر روی استخراج DNA میگو توسط چهار کیت انجام گرفت نتایج بهتری را نشان می‌دهد (۴۸) و نسبت به روش‌های زمانبر دیگر نظیر روش فنل-کلروفورم مقدار DNA قابل قبولی بدست آمد (۴۹). اعداد به‌دست آمده نشان می‌دهد مقدار و کیفیت DNA استخراج شده مناسب می‌باشد و پس از انجام PCR اثر مهاری در انجام PCR دیده نشد.

در این مطالعه مخلوطی از قسمت‌های مختلف میگو نظیر بافت نرم، پوست سخت و پاهای آبششی استفاده گردید که مانع از ایجاد نتایج منفی کاذب به دلیل نقص در جابه‌جایی ویروس (۵۲-۵۰) شده است.

در این مطالعه از آنزیم (Ampliqon TEMPase Hot Start (Start Hot استفاده گردید، استفاده از چنین آنزیم‌هایی به منظور جلوگیری از ایجاد باندهای غیراختصاصی (nonspecific band) در PCR می‌باشد (۵۳) شاید یکی از دلایل دیده نشدن باند غیراختصاصی در این مطالعه همین مورد باشد. نواحی از ژنوم ویروس و میگو انتخاب گردید که محتوای GC آن بالای ۶۰ درصد نبود و به همین دلیل تکثیر قطعات به خوبی انجام گرفت. در طراحی پرایمرها، Self Dimer، cross Dimer و ایجاد باندهای غیراختصاصی مورد توجه قرار گرفت که همگی ایجاد یک PCR موفق نقش دارند. همچنین به‌گونه‌ای طراحی شدند تا قطعات با اندازه‌های نسبتاً کوچک باشند و به راحتی از یکدیگر تفکیک شوند. قطعات کوچک حساسیت بیشتری جهت تشخیص ویروس‌ها (۵۰ و ۵۴) دارند.

پس از انجام PCR و مشاهده نتایج بر روی ژل الکتروفورز پرایمر سنتز کننده قطعه ۱۹۲ جفت باز به دلیل عدم هماهنگی نتایج این قطعه با نتایج کیت مرجع حذف گردید و در نهایت ۳ جفت پرایمر سنتز کننده قطعات ۷۵۴، ۵۵۳ و ۳۵۲ جفت باز جهت تشخیص بیماری انتخاب گردیدند.

نتیجه‌گیری

مجموعه پرایمرهای سنتز کننده قطعات ۷۵۴، ۵۵۳ و ۳۵۲ جفت باز بکار گرفته شده در روش PCR تک مرحله‌ای با دقت بالا می‌تواند آلودگی به ویروس لکه سفید در میگو را شناسایی کند و می‌تواند به‌عنوان یک مالتیپلکس جدید در تشخیص این ویروس در میگو معرفی گردد. این روش در مقایسه با PCR دو مرحله‌ای منجر به صرفه‌جویی در هزینه، زمان و کاهش آلودگی می‌شود.

سپاس و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از پروفسور ایرج نبی‌پور رییس مرکز زیست فناوری دریایی و آقایان دارا جوکار، علی درخشنده و دکتر محسن کشاورز جهت فراهم‌آوری بستر مناسب جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

این مقاله تحت حمایت مالی هیچ سازمان با مؤسسه‌ای نمی‌باشد.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Pradeep B, Shekar M, Karunasagar I, et al. Characterization Of Variable Genomic Regions Of Indian White Spot Syndrome Virus. Virology 2008; 376(1): 24-30.

2.Joseph TC, James R, Rajan LA, et al. White Spot Syndrome Virus Infection: Threat To Crustacean Biodiversity In Vembanad Lake, India. Biotechnol Rep 2015; 7: 51-4.

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

3.Flegel TW, Lightner DV, Lo CF, et al. Shrimp Disease Control: Past, Present And Future. Diseases In Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines 2008; 505: 355-78.
4.Wang CH, Lo CF, Leu JH, et al. Purification And Genomic Analysis Of Baculovirus Associated With White Spot Syndrome (WSBV) Of Penaeus Monodon. Dis Aquat Organ 1995; 23(3): 239-42.
5.Van Hulten MC, Tsai MF, Schipper CA, et al. Analysis Of A Genomic Segment Of White Spot Syndrome Virus Of Shrimp Containing Ribonucleotide Reductase Genes And Repeat Regions. J Gen Virol 2000; 81(2): 307-16.
6.Yang F, He J, Lin X, et al. Complete Genome Sequence Of The Shrimp White Spot Bacilliform Virus. J Virol 2001; 75(23): 11811-20.
7.Van Hulten MC, Witteveldt J, Snippe M, et al. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 Is Involved In The Systemic Infection Of Shrimp. Virology 2001; 285(2): 228-33.
8.Parrilla-Taylor DP, Vibanco-Pérez N, Durán-Avelar MDJ, et al. Molecular Variability And Genetic Structure Of White Spot Syndrome Virus Strains From Northwest Mexico Based On The Analysis Of Genomes. FEMS Microbiol Lett 2018; 365(20): fny216.
9.Oakey HJ, Smith CS. Complete Genome Sequence Of A White Spot Syndrome Virus Associated With A Disease Incursion In Australia. Aquaculture 2018; 484: 152-9.
10.Leu JH, Yang F, Zhang X, et al. Whispovirus. In: Van Etten JL editor. Lesser Known Large dsDNA Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 328. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, 197-227.
11.Pradeep B, Rai P, Mohan SA, et al. Biology, Host Range, Pathogenesis And Diagnosis Of White Spot Syndrome Virus. Indian J Virol 2012; 23(2): 161-74.
12.Chou HY, Huang CY, Wang CH, et al. Pathogenicity Of A Baculovirus Infection Causing White Spot Syndrome In Cultured Penaeid Shrimp In Taiwan. Dis Aquat Organ 1995; 23(3): 165-73.
13.Rajan PR, Ramasamy P, Purushothaman V, et al. White Spot Baculovirus Syndrome In The Indian Shrimp Penaeus Monodon And P. Indicus. Aquaculture 2000; 184(1-2): 31-44.
14.Lightner DV. A Handbook Of Shrimp Pathology And Diagnostic Procedures For Diseases Of Cultured Penaeid Shrimp. Baton Rouge (La.): World Aquaculture Society, 1996, 11.
15.Debnath PP, Karim E, Haque MA, et al. Prevalence Of White Spot Syndrome Virus In Brood Stock, Nauplii And Post-Larvae Of Tiger Shrimp (Penaeus Monodon Fabricius, 1798) In Bangladesh. J Adv Sci Res 2012; 3(3): 58-63.
16.Verbruggen B, Bickley LK, Van Aerle R, et al. Molecular Mechanisms Of White Spot Syndrome Virus Infection And Perspectives On Treatments. Viruses 2016; 8(1): 23.
17.Wu H, Zhang J, He Y, et al. A Metabolic Study In Hepatopancreas Of Litopenaeus Vannamei Response To White Spot Syndrome Virus. Int Aquat Res 2017; 9: 195-201.
18.Oidtmann B, Dixon P, Way K, et al. Risk Of Waterborne Virus Spread–Review Of Survival Of Relevant Fish And Crustacean Viruses In The Aquatic Environment And Implications For Control Measures. Rev Aquacult 2018; 10(3): 641-69.
19.Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, et al. Historic Emergence, Impact And Current Status Of Shrimp Pathogens In The Americas. J Invertebr Pathol 2012; 110(2): 174-83.
20.Stentiford GD, Neil DM, Peeler EJ, et al. Disease Will Limit Future Food Supply From The Global Crustacean Fishery And Aquaculture Sectors. J Invertebr Pathol 2012; 110(2): 141-57.
21.Sánchez-Martínez JG, Aguirre-Guzmán G, Mejía-Ruíz H. White Spot Syndrome Virus In Cultured Shrimp: A Review. Aquac Res 2007; 38(13): 1339-54.
22.Chanratchakool P, Phillips MJ. Social And Economic Impacts And Management Of ShrimpDisease Among Small-Scale Farmers In Thailand And Vietnam. In: Arthur JR, Phillips MJ, Subasinghe RP, Reantaso MB, MacRae IH, editors. Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-scale, Aquaculture Development. FAO Fish Tech Pap 2002, No.406, 177-89.

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

23.Tendencia EA, Bosma RH, Verreth JA. White Spot Syndrome Virus (WSSV) Risk Factors Associated With Shrimp Farming Practices In Polyculture And Monoculture Farms In The Philippines. Aquaculture 2011; 311(1-4): 87-93.
24.Dey BK, Dugassa GH, Hinzano SM, et al. Causative Agent, Diagnosis And Management Of White Spot Disease In Shrimp: A Review. Rev Aquacult 2020; 12(2): 822-65.
25.Yoganandhan K, Thirupathi S, Hameed AS. Biochemical, Physiological And Hematological Changes In White Spot Syndrome Virus-Infected Shrimp, Penaeus Indicus. Aquaculture 2003; 221(1-4): 1-11.
26.Escobedo-Bonilla CM, Wille M, Sanz VA, et al. Pathogenesis Of A Thai Strain Of White Spot Syndrome Virus (WSSV) In Juvenile, Specific Pathogen-Free Litopenaeus Vannamei. Dis Aquat Organ 2007; 74(2): 85-94.
27.Durand SV, Lightner DV. Quantitative Real Time PCR For The Measurement Of White Spot Syndrome Virus In Shrimp. J Fish Dis 2002; 25(7): 381-9.
28.Tan LT, Soon S, Lee KL, et al. Quantitative Analysis Of An Experimental White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection In Penaeus Monodon Fabricius Using Competitive Polymerase Chain Reaction. J Fish Dis 2001; 24(6): 315-23.
29.Chang PS, Lo CF, Wang YC, et al. Identification Of White Spot Syndrome Associated Baculovirus (WSBV) Target Organs In The Shrimp Penaeus Monodon By In Situ Hybridization. Dis Aquat Organ 1996; 27(2): 131-9.
30.Lo CF, Ho CH, Chen CH, et al. Detection And Tissue Tropism Of White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) In Captured Brooders Of Penaeus Monodon With A Special Emphasis On Reproductive Organs. Dis Aquat Organ 1997; 30(1): 53-72.
31.Chen IT, Lee DY, Huang YT, et al. Six Hours After Infection, The Metabolic Changes Induced By WSSV Neutralize The Host's Oxidative Stress Defenses. Sci Rep 2016; 6: 27732.
32.Pan X, Zhang Y, Sha X, et al. Highly Sensitive Detection Of Low-Abundance White Spot Syndrome Virus By A Pre-Amplification PCR Method. J Microbiol Biotechnol 2017; 27(3): 471-9.
33.Menasveta P. Improved Shrimp Growout Systems For Disease Prevention And Environmental Sustainability In Asia. Rev Fish Sci 2002; 10(3-4): 391-402.
34.Van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, et al. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. Virology 2001; 286(1): 7-22.
35.Goldsmith CS, Miller SE. Modern Uses Of Electron Microscopy For Detection Of Viruses. Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 552-63.
36.Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic Electron Microscopy Is Still A Timely And Rewarding Method. J Clin Virol 1999; 13(1-2): 105-19.
37.Chaivisuthangkura P, Longyant S, Rukpratanporn S, et al. Enhanced White Spot Syndrome Virus (WSSV) Detection Sensitivity Using Monoclonal Antibody Specific To Heterologously Expressed VP19 Envelope Protein. Aquaculture 2010; 299(1-4): 15-20.
38.Makesh M, Koteeswaran A, Chandran NDJ, et al. Development Of Monoclonal Antibodies Against VP28 Of WSSV And Its Application To Detect WSSV Using Immunocomb. Aquaculture 2006; 261(1): 64-71.
39.Vaniksampanna A, Longyant S, Wangman P, et al. Enhancement And Confirmation Of White Spot Syndrome Virus Detection Using Monoclonal Antibody Specific To VP 26. Aquacult Res 2017; 48(4): 1699-710.
40.Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, et al. Simultaneous And Rapid Detection Of White Spot Syndrome Virus And Yellow Head Virus Infection In Shrimp With A Dual Immunochromatographic Strip Test. J Virol Methods 2011; 173(1): 85-91.
41.Burgesser KM, Hotaling S, Schiebel A, et al. Comparison Of PCR, Virus Isolation, And Indirect Fluorescent Antibody Staining In The Detection Of Naturally Occurring Feline Herpesvirus Infections J Vet Diagn Invest 1999; 11(2): 122-6.
42.Mott J, Rikihisa Y, Zhang Y, et al. Comparison Of PCR And Culture To The Indirect Fluorescent-Antibody Test For Diagnosis Of Potomac Horse Fever. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2215-9.

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

43.Poulos BT, Pantoja CR, Bradley-Dunlop D, et al. Development And Application Of Monoclonal Antibodies For The Detection Of White Spot Syndrome Virus Of Penaeid Shrimp. Dis Aquat Organ 2001; 47(1): 13-23.
44.Rahman S, Hasan J, Hoq ME. Investigation On White Spot Syndrome Virus (WSSV) In Penaeus Monodon Brood, Nauplii, Post Larvae And Cultured Shrimp In Cox's Bazar, Bangladesh By Using Nested PCR Techniques. Pak J Mar Sci 2018; 27(1): 1-10.
45.Nunan LM, Lightner DV. Optimized PCR Assay For Detection Of White Spot Syndrome Virus (WSSV). J Virol Methods 2011; 171(1): 318-21.
46.Aktar S, Parvez MS, Islam HR, et al. Multiplex-PCR Protocol Development For Rapid Screening Of White Spot Syndrome Virus (WSSV) In Shrimp. J Fisheries 2020; 8(3): 885-90.
47.Sritunyalucksana K, Srisala J, McColl K, et al. Comparison Of PCR Testing Methods For White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infections In Penaeid Shrimp. Aquaculture 2006; 255(1-4): 95-104.
48.Xue M, Wu L, He Y, et al. Biases During DNA Extraction Affect Characterization Of The Microbiota Associated With Larvae Of The Pacific White Shrimp, Litopenaeus Vannamei. PeerJ 2018; 6: e5257.
49.Dehghani P, Zolgharnein H, Nabipour I, et al. Molecular Identification of the Persian Gulf Sea Hare (Aplysia sp.) Based on 16s rRNA Gene Sequence. Iran South Med J 2021; 24(1): 78-87. (Persian)
50.Hossain MS, Otta SK, Chakraborty A, et al. Detection Of WSSV In Cultured Shrimps, Captured Brooders, Shrimp Postlarvae And Water Samples In Bangladesh By PCR Using Different Primers. Aquaculture 2004; 237(1-4): 59-71.
51.Shekhar MS, Azad IS, Ravichandran P. Comparison Of Dot Blot And PCR Diagnostic Techniques For Detection Of White Spot Syndrome Virus In Different Tissues Of Penaeus Monodon. Aquaculture 2006; 261(4): 1122-7.
52.Sritunyalucksana K, Apisawetakan S, Boon-Nat A, et al. A New RNA Virus Found In Black Tiger Shrimp Penaeus Monodon From Thailand. Virus Res 2006; 118(1-2): 31-8.
53.Green MR, Sambrook J. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harb Protoc 2018; 2018(5): pdb.prot095125.
54.Ayub F, Sarker MY, Alam MS. Prevalence Of White Spot Syndrome Virus Infection Detected By One-Step And Nested PCR In Selected Tiger Shrimp (Penaeus Monodon) Hatcheries. Aquacult Int 2008; 16: 405-15.

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]

Original Article

Design and Evaluation of a PCR Method for Detecting White Spot Syndrome Virus in Shrimp

H. Moein (MS)[1], F. Kafilzadeh (PhD)[1**], MR. Miri (PhD)[2], M. Khalilpazir (PhD)[3]*

[1] Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

[3] Iranian Shrimp Research Center,Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extention Organization (AREEO), Bushehr, Iran

(Received 10 Jul, 2021 Accepted 11 Oct, 2021)

Abstract

Background: White spot syndrome virus (wssv) is the causing agent for white spot disease in shrimp and many crustaceans. This disease is highly contagious and can cause death within 3–10 days under normal culture conditions. Therefore, early diagnosis of the virus is a necessity.

Materials and Methods: Primers were designed for three regions of the virus genome and one region of the shrimp genome so that they could function together in a reaction. DNA was extracted from 40 samples of shrimp suspected of white spot disease. Primers were then optimized individually to detect white spot virus and after selecting the most suitable one, the virus was detected simultaneously by two pairs of primers. Shrimp genome replication primers were also used as internal control.

Results: Among the designed primers, three pairs of primers were selected that amplified one fragment of the shrimp genome and two fragments of the virus genome. Of the 40 samples examined, 28 samples were positive (infected with the virus) and 12 samples were negative, which completely matched the results obtained with the reference kit.

Conclusion: To detect white spot virus, examination of two regions of the virus genome is sufficient and reduces the possibility of false negatives. It is also effective to use the shrimp genome to control DNA extraction and PCR steps. The single-step method (PCR) is preferable to the two-step method (Nested PCR) due to its reduced probability of contamination and ease of use.

Keywords: White Spot Syndrome, Virus, PCR, Diagnosis

Cite this article as: Moein H, Kafilzadeh F, Miri MR , Khalilpazir M. Design and Evaluation of a PCR Method for Detecting White Spot Syndrome Virus in Shrimp. Iran South Med J 2021; 24(5): 469-480

[**]*Address for correspondence*: Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Email: f.kafilzadeh@gmail.com
*ORCID: 0000-0002-2240-217X
**ORCID: 0000-0003-2506-7140

[DOI: 10.52547/ismj.24.5.469]