مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای ایران ۱۳۸۸، سال ششم،شماره ۴

مقایسه دو روش هیستوپاتولوژی و Multiplex-PCR در تشخیص بیماری یرسینیوز(*Yersinia ruckeri*) در تعدادی ازمزارع پرورشی ماهیان قزل آلای کشور

دکترعادل حقیقی خیابانیان اصل[۱]،مهندس محمد رضا روزبهانی[۲و۳]،دکتربهرام کاظمی[۳و۴]

GPathologist@gmail.com

Haghighi@srbiau.ac.ir

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی-گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، تهران، ایران

۲- پژوهشکده مهندسی جهاد کشاورزی، تهران، ایران

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

۴- 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. 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 . هدف از این تحقیق مقایسه دو روش تشخیصی histopathology & PCR در تشخیص بیماری یرسینوز یا بیماری دهان قرمز روده ای (ERM)است.(*Enteric Redmouth Disease*, یا *Blood Spot Disease*) در ماهی قزل آلا در ایران است.

در این مطالعه در آزمایشات مبتنی بر PCR ، دی ، ان ، آ (DNA) مورد استفاده در هر واکنش PCR از بافت ماهی های قزل آلای مشکوک به بیماری استخراج و محصول واکنشPCR ، با استفاده از ژل الکتروفورز رو ئیت می‌گردد. در پایش پاتولوژی، از بافت ماهی های زنده یا در حال مرگ ،فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰٪ سالین استفاده شده است. سپس نمونه ها در قالب های پارافین تثبیت و بوسیله میکروتوم های دیجیتال به ضخامت ۵-۷ میلیمتر برش داده شدند. اسلاید های آماده شده بوسیله Hematoxillin & Eosin رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

[1] Enteric red mouth disease (ERM)

در این تحقیق ۲۰ نمونه مشکوک که علائم کلینیکی تیپیک از قبیل سپتی سمی حاد در بافت های داخلی و وخونریزی سطحی در اطراف دهان و مقعد از خود بروز می دادند، با تکنیک های یاد شده مورد ازمایش قرار گرفتند که در نتیجه نهایی آزمایشات بر روی نمونه های مشابه، در روش PCR تعداد نمونه های مثبت ۲عدد و در روش پاتولوژیک این تعداد ۵عدد بود.

مقدمه

یرسینیا راکری ، کوکوباسیلی گرم منفی و از باکتری های بدون اسپور خانواده*Enterobacteriaceae* مي باشد که اغلب تاژکدار هستند.(Rucker, 1966; Tobback *et al*., 2007)

یکی ازشایع ترین و مرگبار ترین، بیمارهای باکتریائی در مزارع پرورش ماهی قزل آلا (آزاد ماهیان) بیماری یرسینوزیس یا بیماری دهان قرمز روده ای(ERM) است.[۲] این بیماری اولین بار در دهه ۱۹۵۰ و از یک کارگاه پرورش ماهی قزل آلا *Onchorhynchus mikiss*) در ایداهو امریکا واقع در دره هگرمن گزارش شد.(Bullock et al., 1978; Rucker, 1966; Gibello et al., 1999; Tobback et al., 2007)

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، خونریزی های چشم و اطراف مقعد، تورم روده در نتیجه تجمع مایعات در آن، سپتی سمی های عمومی(Rucker, 1966; Gibello et al., 1999; Avci and Birincioglu, 2005; Tobback et al., 2007). همراه با التهاب، خونریزی اندام هایی مثل بادکنک شنا ، سیاه و تیره شده و روده متورم و مملو از مایعات چرکی کدر و خونریزی و بزرگی اندام های طحال، کلیه در ماهیان بیمار به عنوان شاخصه های بالینی و پاتولوژیکی بیماری هستند(تصاویرAوBوC از مولف و همکاران)

صور مختلفی از کاربرد تکنیک PCR در تشخیص عامل باکتریایی مولد بیماری یرسینیوزیس توسط محققین و دانشمندان بسیاری پیشنهاد شده است (Argenton et al., 1996; Gibello et al., 1999; Altinok et al., 2001; Lejeune and Rurangirwa, 2000; Coquet et al., 2002; DelCerro et al., 2002; Roozbahani et al., 2009)

از سوی دیگر یکی از سودمند ترین و رایج ترین متد های پایش کلینیکی ومطالعه میکروسکوپیک یرسینیوزیس، روش پاتولوژیک است. (R.J Roberts.2001) ضمن اینکه تکنیک histopathology از بهترین روش های تشخیصی است که می توان نتایج حاصل از آنرا با نتایج تکنیک PCR مقایسه و انطباق آنها را مطالعه نمود.

2 - Enteric Red mouth Disease(ERM)

تصوير (A) معاينه باليني ماهيان قزل آلا ي مبتلا به عفونت يرسينيوز به همراه تيرگي رنگ بدن

تصوير (B) معاينه باليني ماهيان قزل آلا ي مبتلا به عفونت يرسينيوز به همراه زخم و پتشي روي مخاط زبان

تصوير (C) معاينه باليني ماهيان قزل آلا ي مبتلا به عفونت يرسينيوز به همراه اگزوفتالميا و خونريزي شديد جلدي

مواد و روش ها

این تحقیق در بازه زمانی سپتامبر ۲۰۰۸ تا سپتامبر ۲۰۰۹ در تهران- ایران صورت پذیرفته است. کلیه نمونه های مورد بررسی در این آزمایش از جمعیت های ماهیان قزل الا که علائم اولیه بیماری را از خود بروز داده اند از استان های مازندران -جاده هراز و گلستان(در قالب نمونه های برنامه کنترل بهداشتی) گرد اوری شده است، که باهماهنگی سازمان دامپزشکی بصورت یخ زده یاحمل و نگهداری درالکل اتیلیک ۲۰ درصد جهت آزمایشاتPCR ،حمل و نگهداری در فرمالین ۱۰درصد سالین جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی به ازمایشگاه منتقل شده اند.

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 دستور العمل 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 ژن های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و 18S rRNA *Oncorhynchus mykiss* در ماهی در یک واکنش MultiplexPCR که پیش از این توسط روزبهانی و همکاران ارائه شده، استفاده شد. اطلاعات مربوط به پرایمر های انتخابی به نام های (YER3, YER4 & Onmy F,Onmy R) و شرایط واکنش PCR در جدول زیر آمده است.

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

PCR	Primer name	Primer sequence (٥′-٣′)	Expected size	PCR condition
Multiplex	*YER٣*	٥`- *CGA GGA GGA AGG GTT AAG T*-٣		
	YER٤	٥`- *AAG GCA CCA AGG CAT CTC T*-٣	*٥٧٣bp*	*٩٤ °C ٢min, ٣٠ cycles (٩٤ °C ٣٠s,*
٥٥ °C				
	Omny F	٥`- *CTG TGG CAA TTC TAG AGC* -٣`		*٣٠ sec, ٧٢ °C ٣٠ sec) ٧٢ °C ٥min*
	Omny R	٥`- *CGT CCC TCT TAA TCA TGG* -٣`	*٧٥٢ bp*	

هر یک از واکنش های 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 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. .(McPherson et al., 2000)

- الکتروفورز

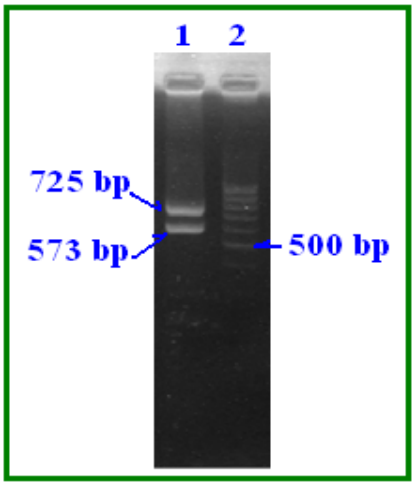
پس از اتمام واکنش مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید و تابش نور UV با طول موج ۲۶۰ نانومتربا دستگاه ترانس ایلومیناتور مورد بررسی و مشاهده قرار گرفت..(Boffy, 1984) در این مرحله از مارکر وزنی DNA 100bp شرکت فرمنتاس و نمونه کنترل مثبت سازمان دامپزشکی (اخذ شده ازآزمایشگاه مرکز تشخیص) استفاده شد.

آزمایشات مبتنی بر هیستو پاتولوژی

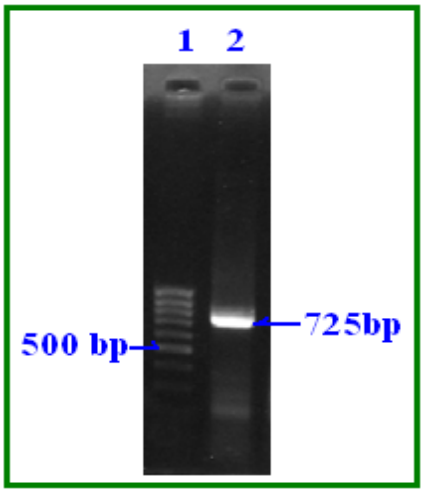
در آزمایشات هیستو پاتولوژی از روش آماه سازی استاندارد، استفاده شد. بطوری که، بافت های هدف از جمله کبد،کلیه،طحال و روده ماهی های زنده یا در حال مرگ، در محلول فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. سپس نمونه ها در قالب های پارافین تثبیت و بوسیله میکروتوم دیجیتال به ضخامت ۵-۷ میلیمتر برش داده شدند. اسلاید های آماده شده بوسیلهhaematoxillin & eosin رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند. (R.J Roberts,2001)

نتایج:

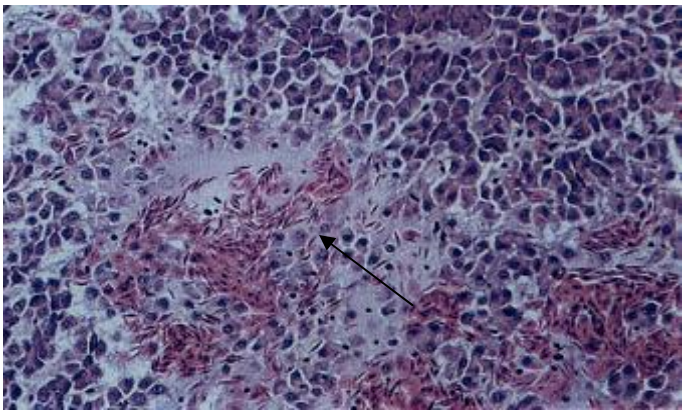
در مجموعه آزمایشاتPCR، هر میکرو تیوب محتوي DNA استخراجی از بافت ماهی قزل آلا ی مشکوک به بیماری و جفت پرایمرهای طراحی شده مبتنی بر توالی ژن های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و 18S rRNA ماهی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* است. شکل شماره ۱ و ۲ نشان دهنده الکتروفورز محصول Multiplex PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ است بطوری که در نمونه های مثبت باند های ۵۷۳bp و ۷۲۵bpبه ترتیب مربوط به ژن های 16S rRNA باکتری *Yersinia ruckeri* و 18S rRNA ماهی قزل آلا*Oncorhynchus mykiss* و در نمونه های منفی باند ۷۲۵bp مربوط به ژن 18S rRNA ماهی قزل آلا*Oncorhynchus mykiss* به عنوان کنترل واکنش PCR، قابل روئیت است. همانطور که مشاهده می شود در نمونه های منفی تنها قطعه مربوط به ژن میزبان به عنوان کنترل واکنش PCR تکثیر شده است ،که خود این مسئله صحت انجام آزمایش ملکولی را تایید می نماید، در مقابل در نمونه های مثبت، توالی های ژنی میزبان و پاتوژن هر دو آمپلی فای و تکثیر شده اند. از مجموع ۲۰ نمونه مورد آزمایش به روش PCR ، ۲ مورد مثبت و ۱۸ مورد، منفي گزارش شد در مقابل در آزمایشات هیستوپاتولوژی از نمونه های مذکور ۵ مورد مثبت و۱۵ مورد، منفی گزارش شد. همانطور که درا شکال شماره ۳و۴و۵ نشان داده شده است، خونریزی و ایجاد کانون های نکروتیک و هجوم کلنی های باکتریایی در بافت های کبد، کلیه و طحال قابل مشاهده است(Haghighi.A 2008)



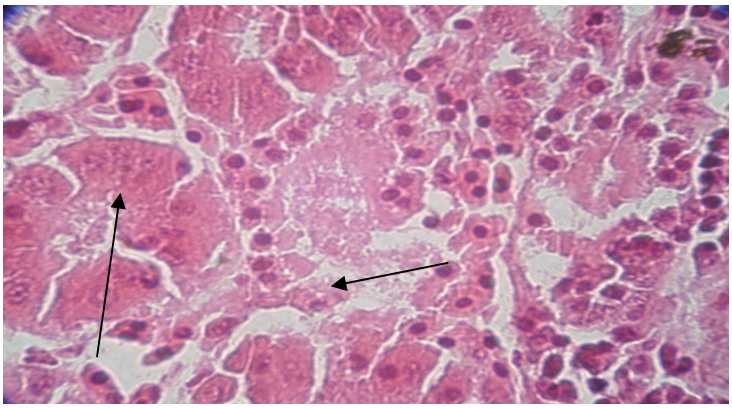
شکل ۱-الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ . در نمونه های مثبت هر دو باند مربوط به محصول PCR تکثیر شده از ژن ماهی و ژن پاتوژن در کنار مارکر 100bp قابل روئیت است



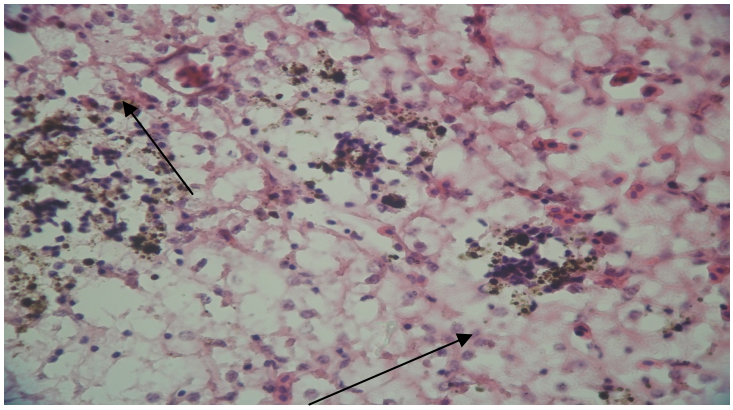
شکل ۲-الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ . در نمونه های منفی فقط محصول PCR تکثیر شده از ژن ماهی در کنار مارکر 100bp قابل روئیت است



شکل ۳: تصویرهیستو پاتولوژی بخشی از کانون های خونریزی و نکروز در بیماری یرسینیوزیس به همراه کلنی باکتریایی در کبد (H&E staining)



شکل٤: تصویر ضایعات هیستوپاتولوژی از نکروز در توبول های پروکسیمال کلیوی در بیماری یرسینیوزیس (H&E staining)



شکل٥: کلنی باکتریایی در طحال به همراه کانون های نکروتیک و تجمع هموسیدرین به رنگ سبز حنایی متمایل به زرد در بیماری یرسینیوزیس (H&E staining)

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از ازمایشات PCR and Histopathology

نتایج	درصد PCR	در صد هیستوپاتولوژی	تعداد نمونه های 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، مبین این مهم است که عامل یرسینیوز را می توان در استخر های تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلای کشور یافت. شدت بروز بیماری به مقاومت ماهی، فاکتور های استرس زا 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 جمعیت های ماهیان به منظور ایزولاسیون و قرنطینه ماهیانِ 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 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 حدود۲۰٪ کل هزینه های تولید این صنعت می باشد.با التفات به اهمیت صنعت پرورش آبزیان دربخش دام وکشاورزی کشور و از طرف دیگر بدلیل تعدد زیستگاه های طبیعی و مصنوعی آزاد ماهیان و میزبانان دیگر این بیماری از جمله تاس ماهیان، تشخیص قطعی بیماری حاصل ازعامل مولد یرسیینیوزیس 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. باکتری ها دارای سکانس ژنی 16SrRNA اختصاصی هستند که درتوالی موجودات دیگر مشاهده نمی شود،نیز هدف و رهیافت خوبی برای PCR می باشد.

در هر دو روش آزمایشگاهی یاد شده ، نمونه های 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 مثبتِ کسب شده بیانگر این است که اگرچه تکنیک PCR یکی از سریع ترین و حساس ترین روش های جایگزین تشخیصی در پایش یرسینیوزیس است اما بعضا در تشخیص عوامل بیماری زا در بافت هایی که بدلایل مختلف سلول های آنها تجزیه و یا دچار نکروز شدید شده اند از کار آمدی کمتری بر خوردار است، لذا روش پاتولوژی یکی از بهترین روش های تشخیصی برای نمونه های مرضی و تشخیص علائم پاتوگونومیک بوده، و در کنار روش های ملکولی بسیار سودمند می باشد.هر چند معرفی دو روش تشخیصی مهم و ارزشمند برای رد یابی عامل بیماری یرسینیوز در کشور با تکنیک های هیستوپاتولوژی و ملکولی ،برای اولین بار ایده مناسبی می باشد ،ولی بررسی حدت عامل بیماریزا و پاتوژنیسیتی آن به همراه جداسازی باکتری یرسینیا راکری در مطالعات آتی بسیار مثمر ثمر خواهد بود.

REFERENCES

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.p 76-78

Lejeune, JT. and FR. Rurangirwa, (2000). Polymerase chain reaction for definitive identification of Yersinia ruckeri. J. Vet. Diagn. Invest., 12: 558-561.

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, pp: 9-21.

Roberts ,R.J. (2001)Fish Pathology . Bailliere Tindall. London.chapter of bacterial disease.

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

Rucker, R., (1966). Red mouth disease of rainbow trout (Salmo gairdneri). Bull. Int. Epizoot.,65: 825-830.

Tobback, E., A Decostere, K. Hermans, F. Haesebrouck and K. Chiers, (2007). Yersinia ruckeri infections in salmonid fish. J. Fish. Dis., 30: 257-268.