"مقاله پژوهشی"

مقایسه عملکرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه بهینه‌سازی شده با کیت استاندارد (IQ2000) جهت تشخیص ویروس لکه سفید در میگو

حسین معین[۱]، فرشید کفیل زاده[۱*]، محمد خلیل پذیر[۲]، محمدرضا میری[۳]، تهمینه نوروزی[۳]

۱-گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بوشهر، ایران

۳- مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۸

چکیده

یکی از علل مرگ و میر گسترده در میگوهای پرورشی در مزارع بیماری ویروسی لکه سفید است و باعث تلفات سریع و زیاد در ظرف چند روز می شود، تشخیص به موقع مانع ضرو زیان گسترده مالی می‌شود. تنها روش تشخیص زودهنگام و مطمئن این ویروس روش مولکولی است از ژنوم ویروس برای ناحیه VP28 و ناحیه مرتبط با پروتیین کیناز و از ژنوم میگو برای نواحی ۱۸s ریبوزومال به عنوان کنترل داخلی آغازگرهایی سازگار با هم طراحی شدند. پس از بهینه سازی آغازگرها به صورت multiplex جهت تشخیص ویروس لکه سفید، DNA استخراج شده از ۲۰۰ نمونه میگوی مشکوک به بیماری توسط دو کیت بهینه‌سازی شده و مرجع IQ2000 (تایوانی) مقایسه گردید. از این تعداد، ۹۴ نمونه مثبت (آلوده به ویروس) و ۱۰۶ نمونه منفی بود، که با نتایج بدست آمده با کیت مرجع بجز در ۲ نمونه مطابقت داشت. حساسیت و اختصاصیت کیت طراحی شده در مقایسه با کیت مرجع به ترتیب ۹۸ و ۱۰۰ درصد می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده روش بهینه سازی شده تک مرحله ای این مطالعه می‌تواند جایگزین یا به همراه کیت مرجع استفاده شود.

کلمات کلیدی: ویروس لکه سفید، واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه، تشخیص، میگو، IQ2000

* عهده‌دار مکاتبات: f.kafilzadeh@gmail.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

مقدمه

ویروس بیماری لکه سفید (WSD) عامل نوعی بیماری است که باعث مرگ و میر بالای سخت پوستان می‌شود. مرگ و میر شدید و تلفات سنگین صنعت میگو در بسیاری از کشورهای آسیایی و آمریکای لاتین به دلیل بیماری لکه سفید رخ داده است. اندام‌هایی که از اکتودرم یا مزودرم و سایر بافت‌های مختلف منشأ می‌گیرند، هدف بیماری لکه سفید هستند (Chang *et al.*, 1996). بیماری لکه سفید از طیف وسیعی از سخت پوستان جدا شده است (Peng *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Otta *et al.*, 1999; Vaseeharan *et al.*, 2003). این بیماری می‌تواند تقریباً همه گونه‌های مهم تجاری میگو را آلوده کرده و در طی ۳-۵ روز منجر به مرگ و میر ۱۰۰ درصد شود (Nakano *et al.*, 1994).

ویروس بیماری لکه سفید میگو متعلق به جنس *Whispovirus* و خانواده Nimaviridae است (van Hulten *et al.*, 2001). ویروس بیماری لکه سفید میگو شامل ژنوم دو حلقه ای DNA است (van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). اندازه ژنوم ویروس بیماری لکه سفید میگو حدود ۳۰۰ kbp است، که شامل ۵۳۱ فریم باز (ORF)(Open Reading Frames) است. ۱۸۱ از ORFها به احتمال زیاد پروتئین‌های عملکردی را رمزگذاری می‌کند (van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Mayo, 2002). طبقه بندی و تعیین توالی کامل ژنوم ویروس بیماری لکه سفید میگو به ترتیب توسط مورفی و همکاران (Murphy *et al.*, 2012) و ون هولتن و همکاران (Van Hulten *et al.*, 2000) گزارش شده است.

روش‌های تشخیص در گذشته از روش‌های شناسایی مبتنی بر ریخت شناسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (EM) به سمت روش‌های ایمنی و مولکولی بسیار حساس تکامل یافته اند، که می‌توانند ویروس را به راحتی در حامل‌های بدون علامت تشخیص دهند (Joseph et *al.*, 2015). تشخیص عفونت ویروس بیماری لکه سفید میگو حتی در حیوانات حامل که هیچ علامتی از بیماری را نشان نمی‌دهند را می‌توان از طریق حساس‌ترین روش مولکولی، واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام داد (Kimura *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1996; Umesha *et al.*, 2006). در این بین غربالگری مکرر ویروس در طول دوره کشت، به عنوان اقدام پیشگیرانه انتقال عمودی و افقی، می‌تواند جایگزین مناسبی برای به حداقل رساندن انتشار ویروس بیماری لکه سفید میگو به دلیل فقدان دارو در برابر عفونت باشد (Karim *et al.*, 2012).

به دلیل حساسیت، PCR به عنوان روش انتخابی برای تشخیص ویروس بیماری لکه سفید میگو در مقایسه با سایر روش‌های مبتنی بر DNA مانند southern blot hybridization تبدیل شده است. روش PCR تو در تو (Nested PCR) حساس تر از روش‌های PCR یک مرحله ای موجود

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

برای تشخیص ویروس بیماری لکه سفید میگو بود (Lo *et al.*, 1996).

برای غربالگری مناسب ویروس یک روش تشخیص سریع و کارآمد مورد نیاز است. از بین روش‌های تشخیصی کلاسیک، PCR به دلیل حساسیت بیشتر در تشخیص توجه بیشتری را به خود جلب کرده است (Maeda *et al.*, 1998; Hameed *et al.*, 2002; Chakraborty and Ghosh, 2016) و تجزیه و تحلیل مبتنی بر PCR در حال حاضر در تعدادی از کشورها به عنوان روش ترجیحی برای تشخیص ویروس‌های میگو از جمله ویروس بیماری لکه سفید میگو به کار می‌رود (Withyachumnarnkul 1999; Ganjoor, 2015). رویکرد مبتنی بر PCR، توسعه یافته توسط Lo و همکاران (Lo and Ho *et al.*, 1996) استاندارد مرجع آزمایشگاه‌های غربالگری مشهور در سراسر جهان برای تشخیص ویروس شد (Nunan and Lightner, 2011). علاوه بر Lo و همکاران (۱۹۹۶)، محققان آغازگرهای زیادی بر اساس ژنوم ویروس بیماری لکه سفید میگو طراحی کرده‌اند و انواع مختلفی از پروتکل‌های تشخیص مبتنی بر PCR را توسعه داده‌اند (Otta *et al.*, 1999; Tang and Lightner, 2000; Nunan and Lightner, 2011). با وجود توسعه یافتن روش‌های متفاوت، آن‌ها دارای معایبی نیز هستند، به عنوان مثال؛ پروتکل‌های PCR که تاکنون توسعه یافته اند معمولاً زمان زیادی را می‌طلبند (۳ تا ۵ ساعت با حداقل ۴۰-۶۰ چرخه حرارتی تقویتی) و نیاز به حجم زیادی از معرف‌ها (۲۰ تا ۲۵ میکرولیتر) در یک لوله برای یکبار عملکرد دارند و هزینه بر هستند (Yang *et al.*, 2006). علاوه بر این، پروتکل‌های معمولی مونوپلکس تنها می‌توانند حضور ویروس بیماری لکه سفید میگو را در یک لوله بدون اثبات حضور میزبان که نیاز به واکنش لوله دیگری دارد، تأیید کنند. همچنین در طول PCR تو در تو به دلیل باز شدن میکروتیوب‌ها، محصولات PCR در معرض آلودگی متقابل هستند (Sritunyalucksana *et al.*, 2006a; Nunan and Lightner, 2011).

با بهینه سازی یک روش ساده PCR برای تشخیص همزمان ویروس با میزبان (یعنی میگو) در یک واکنش تک لوله ای که به طور مرسوم می‌تواند به عنوان PCR مالتیپلکس (Multiplex PCR) تعریف شود، می‌توان از مشکلات فوق جلوگیری کرد. PCR مالتیپلکس نوعی از PCR است که به وسیله آن دو یا چند مکان همزمان در یک واکنش لوله ای با استفاده از مجموعه‌های آغازگر متعدد تکثیر می‌شوند که در آن هر یک از جفت آغازگرها باید از نظر تمام شرایط بهینه شوند تا همه جفت آغازگرها بتوانند در دمای بازپخت (Annealing) یکسان کار کنند (Chamberlain *et al.*, 1988). استفاده از تجزیه و تحلیل حاصل از PCR مالتیپلکس

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

توانایی تشخیص سریعتر را فراهم می‌کند و می‌تواند هزینه واکنش و همچنین نیروی کار را کاهش دهد (Lightner, 1996; Yang *et al.*, 2006). بنابراین، این مطالعه با هدف بهینه سازی یک پروتکل PCR مالتیپلکس تک مرحله ای که می‌تواند به راحتی برای غربالگری همزمان و سریع حضور ویروس بیماری لکه سفید میگو در میگو استفاده شود، انجام شد و در نتیجه زمان کلی انجام واکنش ، مقدار واکنش دهنده‌ها و احتمال انتقال آلودگی را کاهش داد.

بنابراین طراحی، استاندارد سازی و بهینه سازی کیت تشخیص بیماری لکه سفید میگو در این تحقیق ضروری بنظر رسید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در حال حاضر تنها میگوی پرورشی در کل ایران میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) می‌باشد، لذا انتخاب ما محدود به این میگو قرارگرفت. نمونه‌گیری از تیر تا مهر ۱۳۹۹ به طول انجامید. ۲۰۰ نمونه میگو مورد نیاز از سه مزرعه مختلف پرورش میگو دارای سابقه آلودگی به ویروس، به عنوان مزارع منتخب در سایت‌های متفاوت استان بوشهر شامل سایت رودشور، بندر ریگ و شیف (با فواصل ۴۰ کیلومتر) انتخاب شدند. نمونه ها در شرایط کاملا استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه حمل شدند. تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگه‌داری شدند.

استخراج DNA

پس از آماده سازی و شماره گذاری نمونه‌ها، 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 تیغه جراحی استریل شده جدا شدند. نمونه ها در یک لوله میکرو سانتریفیوژ استریل ۱.۵ میلی لیتری قرارگرفت. بافت جدا شده پس از اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر بافر لایز کننده (lysis buffer) 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 (۹۶-۱۰۰٪) به میکروتیوب اضافه و مجموعه به ستون استخراج منتقل شد. آنگاه یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. پس از مرحله اول سانتریفیوژ ۶۰۰ ماکرولیتر از محلول WB1 (Wash Buffer 1) را به ستون اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ تکرار شد. پس ازاتمام سانتریفیوژ و خالی کردن محتویات تیوب Collection میزان ۶۰۰ ماکرولیتر از محلول

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

WB2 (Wash Buffer 2) به ستون اضافه و مجددا 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 یک دقیقه سانتریفیژ 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 نانومترخوانده شد.

به منظور طراحی مناسب multiplex PCR جهت تشخیص WSD، ژنوم میگو ([UID] 7871408 IDs: 2106361 [RefSeq] [GenBank] 8054448) و ویروس ([UID] 6305188 IDs: 6305188 [GenBank]) مورد بررسی قرارگرفت. سرانجام آغازگرهایی با نرم افزار primer3 طراحی گردید (جدول ۱) که قطعات با طول‌های bp ۷۵۴ از ژن ۱۸s ریبوزومال میگو به عنوان کنترل داخلی و آغازگرهای مختص ژنوم ویروس با توانایی تکثیر قطعاتی با طول ۳۰۲ و bp ۵۵۳ را تکثیر می‌نمایند.

انتخاب و ترکیب آغازگر

جدول ۱:مشخصات آغازگرهای طراحی شده

طول قطعه تکثیر شده	قطعه هدف	آغازگر
754 bp	Penaeus vannamei 18S ribosomal RNA	F1:ACTGCAAGTGACATGAACA
		R1:GTCTAAACTCTTCAGTCTAG
553 bp	Proteine kinase 1 (PK1) gene	F2:TTGCATAACCTGTTCCAGTTC
		R2:TTAGTGCCGCGTCTGT
302 bp	Outer membrane protein VP28 gene	F3:GTATCACAACACTGTGACCAA
		R3:ATGTGTTGTTCCACACCTTG

بررسی عملکرد آغازگ

پس از طراحی اولیه آغازگرها برای قطعات مختلف ژنوم ویروس و میگو، عملکرد آغازگرها به صورت جداگانه بررسی شد. همچنین عملکرد ترکیب آغازگرها به صورت استفاده همزمان از قطعه bp ۷۵۴ از میگو به عنوان کنترل داخلی به همراه قطعات ۵۵۳ و bp ۳۰۲ از ویروس انجام شد، همچنین حالات مالتیپلکس با قطعات میگو و ویروس به صورت ۷۵۴، ۵۵۳، ۳۰۲ و ۵۵۳، ۳۰۲ و۷۵۴، ۵۵۳ و ۷۵۴، ۳۰۲ بررسی گردید.

بهینه سازی PCR

بعد از انتخاب بهترین ترکیب آغازگری جهت تشخیص ویروس بیماری لکه سفید در میگو، بهینه سازی آن‌ها انجام شد، بدین

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

صورت 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 آغازگرها در حالت multiplex بهینه سازی گردید.

بررسی عملکرد کیت multiplex PCR

پس از بهینه سازی، به منظور بررسی عملکرد آن، تعداد ۲۰ نمونه بیمار و ۲۰ نمونه سالم که قبلا با کیت تشخیصی IQ2000 (GeneReach Biotechnology corp.) مثبت تشخیص داده شده بودند انتخاب و به صورت دو سو کور آزمایش گردید. پس از انجام PCR جهت بررسی نتایج حاصله، الکتروفورز انجام شد. پس از اطمینان از حصول نتیجه مطلوب همه نمونه‌ها توسط دو کیت مرجع و طراحی شده به صورت همزمان مقایسه گردید.

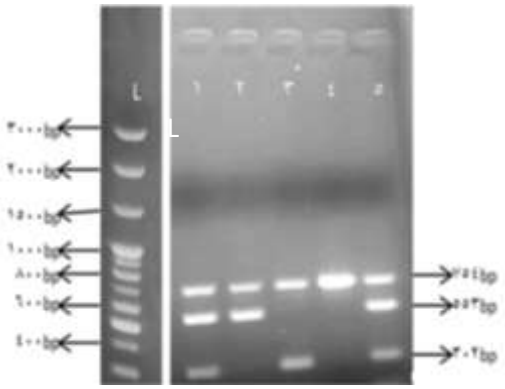
نتایج

استخراج DNA

DNA استخراج شده از ۲۰۰ نمونه میگو به طور میانگین دارای غلظتی معادل ۹۰.۲۲ نانوگرم، جذب ۲۸۰/ ۲۶۰ معادل ۱.۹۶ و جذب ۲۳۰/۲۶۰ معادل ۱.۲۲ بودند.

بررسی عملکرد آغازگرها

۳ جفت آغازگر طراحی شده که یک جفت مربوط به DNA میگو که به عنوان کنترل داخلی و قطعه bp ۷۵۴ را تکثیر می‌کند و ۲ جفت دیگر مربوط به DNA ویروس می‌باشد و قطعات ۳۰۲ و bp ۵۵۳ را تکثیر می‌کنند به صورت جداگانه و ترکیب‌های ۲ تایی و ۳ تایی بررسی شد و نتایج حاصل از انجام PCR بر روی ژل آگارز بررسی گردید (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز ترکیبات مختلف آغازگرها: L) مارکر DNA، ۱و ۵) ترکیب آغازگرهای ۷۵۴،۵۵۳ و۳۰۲bp، ۲) ترکیب آغازگرهای ۵۵۳، ۷۵۴bp، ۳) ترکیب آغازگرهای ۳۹۲، ۷۵۴bp، ۴) آغازگر۷۵۴bp

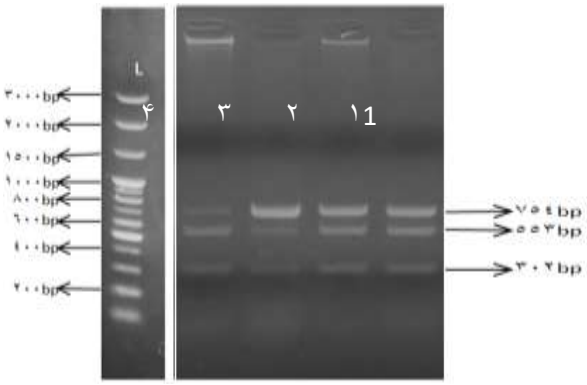
بهینه سازی مقدار DNA

غلظت‌های متفاوت DNA در محدوده ۳۰۰-۱۰ نانوگرم در ماکرولیتر جهت

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

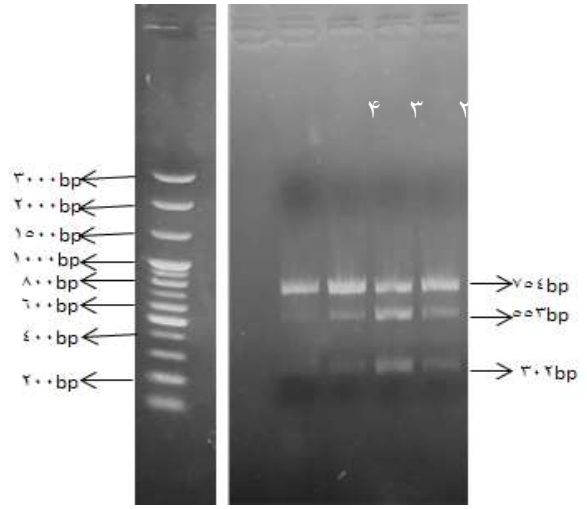
دستیابی به بهترین عملکرد به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که آغازگر طراحی شده در محدوده غلظت‌های ۴۵ نانوگرم به بالا قادر به انجام صحیح تکثیر بوده و بهترین جواب در غلظت ۱۵۰ نانوگرم مشاهده شد (شکل ۲۹).



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

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). 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.

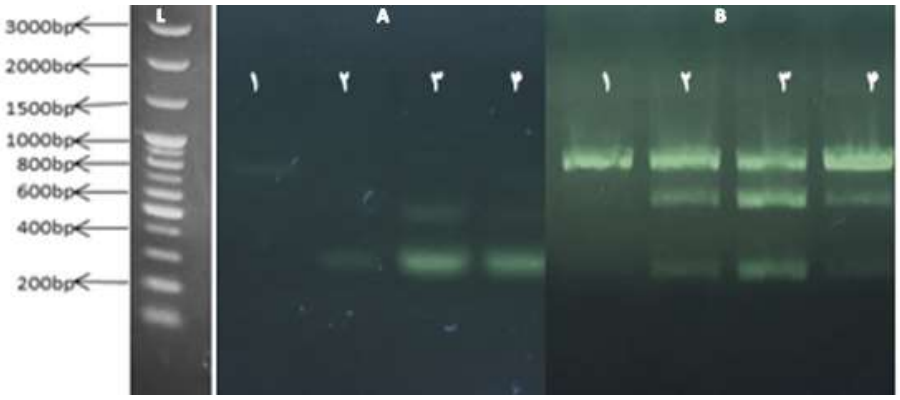


شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از تعداد سیکل‌های متفاوت جهت انجام PCR: L) مارکر DNA، ۱) ۳۰ سیکل، ۲) ۳۳ سیکل، ۳) ۳۵ سیکل ۴) ۳۷ سیکل

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

نتایج عملکرد multiplex PCR

نتایج بدست آمده از تست ۲۰۰ نمونه با multiplex PCR طراحی شده و کیت IQ2000 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 مراحل (B): L) مارکر DNA، ۱) نمونه منفی، ۲) نمونه مثبت، ۳) نمونه مثبت، ۴) نمونه مثبت

۲۰۰ نمونه آزمایش شده نتایجی مشابه با کیت IQ2000 نشان دادند (جدول ۲)، که نشان داد آغازگرهای طراحی شده حساسیت و اختصاصیتی معادل ۹۸ و ۱۰۰ درصد در مقایسه با کیت مورد استفاده در آزمایشگاه‌های ایران (IQ2000) را دارا می‌باشد. حداقل حد تشخیص برای مالتیپلکس طراحی شده در این مطالعه برابر با ۲۰ کپی در هر واکنش مانند کیت مرجع می باشد.

جدول ۲: نتایج حاصل از مقایسه ۲۰۰ نمونه تهیه شده توسط کیت طراحی شده و کیت IQ2000

کیت IQ2000	کیت طراحی شده	
۹۶	۹۴	مثبت (آلوده به ویروس)
۱۰۴	۱۰۶	منفی (میگو سالم)

بحث

روش تشخیص ارجح جهت تشخیص وجود ویروس، روش مولکولی است که شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که شامل PCR تک مرحله‌ای (One step PCR)، Semi nested PCR، دو مرحله‌ای (Two step PCR)، PCR رقابتی کمی (Quantitiative competitive PCR)، RT-PCR (Real time PCR) می‌باشد و حساسیت آغازگر نقش مهمی در موفقیت این روش‌ها ایفا می‌کند (Nunan and Lightner, 2011; Rahman *et al.*, 2018; Aktar *et al.*, 2020; Dey *et al.*, 2020). کیت‌های مرجع مورد استفاده در آزمایشگاه‌های ایران به صورت دو مرحله ای و زمانبر بوده و احتمال آلودگی در آن‌ها زیاد است. لذا بر آن شدیم تا با طراحی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

آغازگرهای اختصاصی و با حساسیت بالا جهت تشخیص توسط PCR تک مرحله‌ای در هزینه و زمان صرفه جویی کرده و عفونت را در مراحل اولیه آلودگی توسط ویروس تشخیص دهیم. مقدار بافت مورد استفاده جهت استخراج DNA ۴۰ میلی‌گرم بوده (Sritunyalucksana *et al.*, 2006b) که از نظر درصد خلوص و غلظت نتایج بهتری را نسبت به کیت‌های دیگر نشان داد (Xue *et al.*, 2018) و اثر مهاری در زمان انجام multiplex PCR دیده نشد. ویروس در زمان استقرار در میزبان ممکن است در همه قسمت‌ها جایگزین نشود که در این مطالعه سعی بر آن شد تا با انتخاب قسمت‌های مختلف بدن میگو تاثیر این مورد در ایجاد نتایج منفی کاذب به حداقل ممکن برسد (Hossain *et al.*, 2004; Shekhar *et al.*, 2006; Sritunyalucksana *et al.*, 2006b).

PCR تک مرحله‌ای، برای تشخیص ویروس لکه سفید در میزبان به تعداد نسخه بالای DNA ویروس نیاز دارد (Otta *et al.*, 1999; Jian *et al.*, 2005). روش PCR دو مرحله ای برای تشخیص ویروس بیماری لکه سفید میگو در اواسط دهه ۱۹۹۰ توسعه یافت (Lo *et al.*, 1996) و از زمان چاپ سوم راهنمای تشخیصی بیماری‌های آبزیان (OIE، ۲۰۰۰) (OIE)، PCR روش توصیه شده برای تشخیص این ویروس است.

پیشرفت در زمینه تنظیم دمای درب و تنظیم شیب دمایی ترموسایکلر، منابع متفاوت انواع معرف و آنزیم Taq امکان سنجش سریعتر توسط PCR را فراهم کرده است. کلایدون و همکاران (Claydon *et al.*, 2004) عنوان کردند، یک قطعه اضافی در هنگام استفاده از روش پیشنهادی Lo و همکاران (Lo *et al.*, 1996) دیده می‌شود، که به دلیل دمای کم (۵۵ درجه سانتی‌گراد) مورد استفاده است که می‌تواند مثبت کاذب ایجاد کند. دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتی گراد خاصیت سنجش را افزایش می‌دهد (Nunan and Lightner, 2011).

در روش RT-PCR که قادر به تعیین کمی ویروس در میگوی آلوده است و به آن PCR کمی(qPCR) نیز گفته می‌شود از رنگ‌های مختلف فلورسنت (به عنوان مثال CyberGreen) یا پروب DNA (به عنوان مثال Taqman Probe) همراه با آغازگر استفاده می‌شود. در هر دو روش، شدت فلورسانس میزان DNA را تعیین می‌کند، در حالی که روش مبتنی بر پروب بسیار حساس است (Durand and Lightner 2002)، بزرگترین عیب آن این است که رنگ‌ها به جای موارد خاص به هر DNA دو رشته‌ای متصل می‌شوند. همچنین، RT-PCR یک روش گران و پیچیده است و در چنین شرایطی، nested PCR بهترین گزینه را نشان می‌دهد (Peinado-Guevara and López-Meyer, 2006). روش استخراج

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

DNA، غلظت الگو و اندازه قطعه تکثیر شده به طور قابل توجهی بر حساسیت روش PCR تأثیر می‌گذارد (Cha and Thilly, 1993). آزمایش PCR تک مرحله ای آلودگی متقاطع را به دلیل عدم نیاز به باز کردن نمونه تقویت شده PCR برای استفاده به عنوان الگو در مرحله دوم nested PCR به حداقل می‌رساند، همچنین زمان کمتر انجام و کاهش هزینه سبب برتری روش PCR یک مرحله‌ای به nested PCR می‌شود (Nunan and Lightner, 2011).

از معایب روش PCRهای طراحی شده تشخیص مثبت کاذب به دلیل عدم اختصاصیت آغازگر طراحی شده و منفی کاذب به دلیل نقص در جایابی ویروس در بافت جدا شده و عدم انجام موفق PCR به دلایلی نظیر ممانعت کننده‌ها و ... است (Claydon *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2004; Shekhar *et al.*, 2006; Sritunyalucksana *et al.*, 2006a).

با توجه به مزایای PCR تک مرحله‌ای نظیر صرفه جویی در هزینه و زمان بر آن شدیم تا با طراحی آغازگر با حساسیت و دقت بالا به روشی سریع برای تشخیص و شناسایی زود هنگام ویروس در مراحل اولیه آلودگی دست یابیم. از ۳ جفت آغازگر طراحی شده ۲ جفت مربوط به ویروس و یک جفت مربوط به میگو که به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از آنزیم (Ampliqon TEMPase Hot Start) Hot Start جهت جلوگیری از ایجاد باندهای غیر اختصاصی (nonspecific band) در PCR استفاده گردید (Green and Sambrook, 2018) به دلیل انتخاب نواحی از ژنوم ویروس و میگو با محتوای GC بالای ۶۰ درصد تکثیر با موفقیت انجام گرفت. در طراحی آغازگر به کوچک بودن قطعات تکثیری ایجاد شده توسط آغازگر که یکی از عوامل افزایش موفقیت در تشخیص ویروس می‌باشد توجه شد (Hossain *et al.*, 2004; Ayub *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری

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

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می دانند از پروفسور ایرج نبی‌پور رییس مرکز زیست

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

فناوری دریایی و آقایان دارا جوکار و علی درخشنده جهت فراهم آوری بستر مناسب جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

منابع

1. Aktar, S., M.S. Parvez, H.M., Islam, R., Ahsan, M.N., 2020. Multiplex-PCR protocol development for rapid screening of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Journal of Fisheries, 8(3), 885-890.
2. Ayub, F., Sarker, M.Y., Alam, M. S., 2008. Prevalence of white spot syndrome virus infection detected by one-step and nested PCR in selected tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. Aquaculture International, 16(5), 405-415.
3. Cha, R.S. Thilly, W.G., 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. Genome Research, 3(3), S18-S29.
4. Chakraborty, S., Ghosh, U., 2014. White spot syndrome virus (WSSV) in crustaceans: an overview of host-pathogen interaction. Journal of Marine Biology & Oceanography, 3(1),
5. Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Rainer, J.E., Nguyen, P.N., Thomas, C., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic acids research, 16(23), 11141-11156.
6. Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C., Kou, G.H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases of aquatic organisms, 27(2), 131-139.
7. Claydon, K., Cullen, B., Owens, L., 2004. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in Cherax quadricarinatus. Diseases of aquatic organisms, 62(3), 265-268.
8. Dey, B.K., Dugassa, G.H., Hinzano, S.M., Bossier, P., 2020. Causative agent, diagnosis and management of white spot disease in shrimp: A review. Reviews in Aquaculture, 12(2), 822-865.
9. Durand, S., Lightner, D., 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Fish Diseases, 25(7), 381-389.
10. Ganjoor, M., 2015. A short review on infectious viruses in cultural shrimps (*Penaeidae family*). Journal of Fisheries and Aquaculture, 6(3), 1-11.
11. Green, M., Sambrook, J. 2018. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harbor protocols, (5).
12. Hameed, A.S., Murthi, B., Rasheed, M., Sathish, S., Yoganandhan, K., Murugan, V., Jayaraman, K., 2002. An investigation of Artemia as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to Penaeus indicus. Aquaculture, 204(1-2), 1-10.
13. Hossain, M.S., Otta, S., Chakraborty, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2004. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. Aquaculture, 237(1-4), 59-71.
14. 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 of Aquatic Organisms, 67(1-2), 171-176.
15. Joseph, T.C., James, R., Rajan, L.A., Surendran, P., Lalitha, K., 2015. White spot syndrome virus infection: Threat to crustacean biodiversity in Vembanad Lake, India. Biotechnology Reports, 7, 51-54.
16. Karim, M., Sarwer, R.H., Brooks, A.C., Gregory, R., Jahan, M.E., Belton, B., 2012. The incidence of suspected white spot syndrome virus in semi-intensive and extensive shrimp farms in B angladesh: implications for management. Aquaculture Research, 43(9), 1357-1371.
17. Kimura, T., Yamano, K., Nakano, H., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology, 31(2), 93-98.
18. Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. 256 p.
19. Lo, C.-F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., K.F., M.S., Liu, Su., Wang, C.H., 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of aquatic organisms, 27(3), 215-225.
20. Lo, C.F., Leu, J.-H., C.H., Ho, C.H., S.E., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of aquatic organisms, 25(1-2), 133-141.
21. Maeda, M., Itami, T., Furumoto, A., Hennig, O., Imamura, T., Kondo, M., Hirono, I., Aoki, T., Takahashi, Y., 1998. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans. Fish Pathology, 33(4), 273-380.
22. Mayo, M., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Archives of virology, 147(8), 1655-1656.
23. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D., 1995. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Springer Science & Business Media, 595 p.
24. Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye K., Oseko, N., 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, Penaeus japonicus, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. Fish Pathology, 29(2), 135-139.
25. Nunan, L.M., Lightner, D.V., 2011. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of virological methods, 171(1), 318-321.
26. OIE. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Office International des Epizooties, Paris.
27. Otta, S., Shubha, G., Joseph, B., Chakraborty, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. Diseases of aquatic organisms, 38(1), 67-70.
28. Peinado-Guevara, L.I,. López-Meyer, M., 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. Aquaculture, 251(1), 33-45.
29. Peng, S., Lo, C., Ho, C., Chang, C., Kou, G., 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii, using polymerase chain reaction. Aquaculture, 164(1-4):, 253-262.
30. Rahman, S., Hasan, J., Hoq, M.E., 2018. 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. Pakistan Journal of Marine Sciences, 27(1), 1-10.
31. Shekhar, M., Azad, I., 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(4), 1122-1127.
32. Sritunyalucksana, K., Apisawetakan, S., Boon-Nat, A., Withyachumnarnkul, B., T. Flegel, W., 2006. A new RNA virus found in black tiger shrimp Penaeus monodon from Thailand. Virus research, 118(1-2), 31-38.
33. Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K., Nielsen, L., Flegel, T.W., 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. Aquaculture, 255(1-4), 95-104.
34. Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in Penaeus japonicus Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in Penaeus monodon Fabricius. Journal of Fish

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

Diseases, 19(5), 399-403.
35. Tang, K.F., Lightner, D.V., 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture, 189(1-2), 11-21.
36. Umesha, K., Dass, B.K.M., Naik, B.M., Venugopal, M., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2006. High prevalence of dual and triple viral infections in black tiger shrimp ponds in India. Aquaculture, 258(1-4), 91-96.
37. Van Hulten, M.C., Tsai, M.-F., Schipper, C.A., Lo, C.-F., Kou, G.-H., Vlak, J.M., 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. Microbiology, 81(2), 307-316.
38. Van Hulten, M.C., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M., 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology, 286(1), 7-22.
39. Vaseeharan, B., Jayakumar, R., Ramasamy, P., 2003. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. Letters in Applied Microbiology, 37(6), 443-447.
40. Wang, Y.-C., Lo, C.-F., Chang, P.-S., Kou, G.-H., 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture, 164(1-4), 221-231.
41. Withyachumnarnkul, B., 1999. Results from black tiger shrimp Penaeus monodon culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or-negative for white-spot syndrome virus (WSSV). Diseases of Aquatic Organisms, 39(1), 21-27.
42. Xue, M., Wu, L., He, Y., Liang, H., Wen, C., 2018. Biases during DNA extraction affect characterization of the microbiota associated with larvae of the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. PeerJ 6, e5257.
43. Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X., 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 75(23), 11811-11820.
44. Yang, B., Song, X L., Huang, J., Shi, C.Y., Liu, Q.H., Liu, L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. Journal of Fish Diseases, 29(5), 301-305.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]

Performance Comparison of Optimized Multiplex Polymerase Chain Reaction with Standard Kit (IQ2000) for White Spot Virus Detection in Shrimp

Moein, H.[1], Kafeilzadeh, F.[1*], Pazir, M.K.[2], Miri, M.[3], Norouzi, T.[3]

1-Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2-National Shrimp Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran.
3-Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.

Received: 9 August 2024 **Accepted: 29 September 2024**

Abstract

One of the main causes of widespread mortality in farmed shrimp is the white spot syndrome virus (WSSV), which can lead to rapid and significant losses within just a few days. Timely diagnosis can prevent extensive financial losses. The only reliable early detection method for this virus is molecular. Primers compatible with each other were designed from the viral genome for the VP28 region and the protein kinase-related region, and from the shrimp genome for the S18 ribosomal region as an internal control. After optimizing the primers for multiplex detection of WSSV, DNA extracted from 200 shrimp samples suspected of being infected with the virus was compared using two optimized kits and the IQ2000 reference kit (from Taiwan). Of these, 94 samples tested positive (infected with the virus) and 106 samples tested negative, with results matching the reference kit except for two samples. The sensitivity and specificity of the designed kit, compared to the reference kit, were 98% and 100%, respectively. Based on these results, the optimized one-step method from this study can be used as a replacement for or in conjunction with the reference kit.

Keywords: White Spot Virus, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Detection, Shrimp, Optimization, IQ2000.

Corresponding Author: f.kafilzadeh@gmail.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-25]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-781]