

Ribarstvo, 57, 1999, (4), 181–188
I. Strunjak–Perović et al.: PCR kao dijagnostička

ISSN 1330–061X
CODEN RIBAEG

UDK 639.2/6.09:616–078
Pregledni članak

PCR KAO DIJAGNOSTIČKA METODA U AKVAKULTURI

I. Strunjak–Perović, N. Topić Popović

Sažetak

PCR je akronim za »polymerase chain reaction« (metoda lančane reakcije polimeraza), tehniku koja se temelji na otkrivanju i umnožavanju specifičnih DNA odnosno RNA sljedova. Može se primijeniti u dijagnostici nasljednih bolesti, forenzici, populacijskoj genetici, sistematici, bioinženjerstvu, evolucijskoj biologiji, pa i u akvakulturi. Ovom je metodom moguće dijagnosticirati niz virusnih, bakterijskih i parazitarnih bolesti riba, školjaka i rakova. Prednosti tehnike očituju se u brzom dobivanju rezultata, visokoj specifičnosti i osjetljivosti.

Ključne riječi: PCR, bolesti, ribe, rakovi, školjke

UVOD

Utvrđivanjem sve većega broja ekonomski važnih bolesti u kontroliranom uzgoju riba, rakova i školjaka, povećala se potreba za brzom i preciznom metodom njihova dijagnosticiranja. Jedna od takvih metoda jest i PCR (engl. polymerase chain reaction). PCR je tehnika koja se temelji na otkrivanju i umnožavanju specifičnih DNA, odnosno RNA sekvenci, a može se, osim u akvakulturi, primijeniti u kliničkoj medicini, dijagnostici nasljednih bolesti, forenzici, populacijskoj genetici, sistematici, tipizaciji tkiva, bioinženjerstvu, prepoznavanju hrane dobivene genetičkim inženjerstvom, kontroli živežnih namirnica, evolucijskoj biologiji itd. Svrha je ovog napisa svratiti pozornost na ovu metodu kao metodu izbora u dijagnostici bolesti riba, rakova i školjaka, te upozoriti na njezine prednosti, ali i nedostatke.

Mr. sc. Ivančica Strunjak–Perović, mr. sc. Natalija Topić Popović, Institut »Ruder Bošković«, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička 54, Zagreb, Hrvatska. e-mail: strunjak@rudjer.irb.hr

LITERATURNI PODACI

Primjena PCR metode u akvakulturi

PCR se u akvakulturi već uvelike primjenjuje, iako još nije uveden kao standardna metoda dijagnosticiranja bolesti organizama koji žive u vodi.

Bakterijske se bolesti uglavnom dijagnosticiraju klasičnim mikrobiološkim metodama koje podrazumijevaju uzgoj uzročnika i njegovu identifikaciju biokemijskim i/ili serološkim testovima. Takve tehnike dugo traju, pa uzimaju i tjedne dragocjena vremena. Iako serološke metode ne zahtijevaju uzgoj bakterija, često zbog nedostatka specifičnih antiseruma ipak nisu zadovoljavajuće. S obzirom na to da je PCR metoda brza, ponovljiva, osjetljiva i strogo specifična, njome se mogu nadopuniti, pa i u cijelosti zamijeniti klasične serološke metode tipizacije. Tako PCR, osim za dijagnostičke testove, daje neprocjenjivo važne podatke i o epizootologiji bakterijskih bolesti (Bernardet, 1996.). Budući da se ovom metodom mogu otkriti bakterije u biološkim uzorcima bez prethodne izolacije na hranjivim podlogama, ne začuđuje da se danas primjenjuje za otkrivanje teško uzgojivih bakterija kao što su *Mycobacterium marinum* (Colorni i sur., 1993.) i *Renibacterium salmoninarum* (Magnusson i sur., 1994.). Toyama i sur. (1996.) su kreirali primjere kojima je moguće umnožiti DNA sekvence specifične za *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* i *F. columnare*. Sojeve iz roda *Vibrio* u uzorcima vode i riba moguće je utvrditi i identificirati unutar relativno kratka razdoblja (11 sati), (Martinez i sur., 1994.). Modificirajući standardnu PCR metodu, Covadonga i sur. (1995.), omogućili su brzo otkrivanje *V. vulnificus*, patogenog za ljude i za ribe. Kroz 24 sata uzročnik se može otkriti u vrlo malom broju i u neuzgojivom obliku, i tako na vrijeme otkloniti rizik od obolijevanja, te smanjiti ekonomske gubitke zbog mortaliteta i antibiotskih terapija. *Aeromonas salmonicida*, uzročnik furunkuloze u riba, na hranjivoj podlozi raste sporo, pa ga druge bakterije u uzorku mogu prerasti i prikriti. Stoga do točne dijagnoze bolesti može proći dosta vremena. PCR metodom moguće je izravno iz bubrega, jetre i fecesa ribe otkriti prisutnost već samo jednoga specifičnog gena *A. salmonicida* (Gustafson i sur., 1992.). Isto tako, u tkivu bolesnih riba može se prepoznati *Yersinia ruckeri* i pouzdano razlikovati od ostalih patogenih i ubikvitarnih bakterija (Argenton i sur., 1996.). Osim spomenutih bakterija, danas su napravljeni PCR protokoli za identifikaciju većine ostalih značajnih bakterija organizama koji žive u vodi (Talaat i sur., 1997.).

PCR-om su obrađene manje-više i sve gospodarstveno značajne virusne bolesti. Tako je ova metoda, upotrijebljena za otkrivanje ribljih rabdovirusa iz različitih kliničkih uzoraka (Bruchhof i sur., 1995; Yoshinaka i sur., 1997; Guillou i sur., 1999.), dala rezultate u vrlo kratkom vremenu. Štoviše, prvi put se uspostavila genetička veza između uzročnika virusne hemoragične septikemije izoliranog iz riba koje obitavaju u europskim obalnim vodama i

virusa koji bolest uzrokuju na ribogojilištima (Stone i sur., 1997.). Budući da je za nekoliko prividno zdravih morskih vrsta (bakalar, haringa, plat) dokazano da su nosioci VHS virusa, autori smatraju da jedan od razloga pojave bolesti u slatkovodnim ribogojilištima može biti i hranjenje ribe netretiranim otpacima zaražene morske ribe. Istodobno uzimajući u obzir učestalost kojom se pojavljuju mutacije u RNA-virusa, kao i nedostano detaljnije znanje o patogenosti VHS-virusa na molekularnoj osnovi, postoji potencijalna opasnost od morskih sojeva VHSV-a koji bi se mogli prilagoditi intenzivnim uvjetima uzgoja (Stone i sur., 1997.). Uzročnik zarazne nekroze gušterače (birnavirus) PCR-om je utvrđen u kliničkim uzorcima čak i kad je uzorak apliciran u staničnu kulturu dao negativne rezultate (Lopez-Lastra i sur., 1994; Blake i sur., 1995.). Stoga bi ova metoda bila malo korisna u otkrivanju ne samo oboljelih riba već i nesimptomatičnih kliconoša kao rezervoara. Osim utvrđivanja same prisutnosti virusa, dobiven je iscrpniji uvid u genomske sličnosti, odnosno različitosti članova *Birnaviridae* (koji se javljaju u vodenoj sredini), što navodi na mišljenje da trenutačna klasifikacija tih virusa nije najprikladnija (Havarstein i sur., 1990; Novoa i sur., 1995.). Istraživanja iridovirusa pokazala su da riblji iridovirusi pripadnici roda *Ranavirusa*, mogu biti u uskoj vezi s virusima vodozemaca i gmazova, pa se ova tehnika i ovdje smatra veoma uspješnom metodom ne samo radi utvrđivanja virusa u uzorku već i njihova povezivanja s ostalim srodnim članovima (Schnitzler i Darai, 1993; Williams i Cory, 1994; Tamai i sur., 1997.). Pojava sličnih virusa kod različitih vrsta domaćina u vodenoj sredini, te njihov međusobni prijenos važan su problem u nadzoru zdravstvenoga stanja riba u kontroliranu uzgoju.

Kako kod bakterijskih i virusnih bolesti, tako se PCR s jednakom uspjehom primjenjuje i u parazitologiji. Tako je moguće otkriti uzročnika vrtičavosti salmonida *Myxobolus cerebralis* u svim njegovim razvojnim stadijima, te na taj način skratiti vrijeme identifikacije spora mikroskopskim postupcima (Andree i sur., 1998.). Osjetljivost PCR metode omogućuje otkrivanje vrlo maloga broja miksosporidija *Ceratomyxa shasta* u zaraženim ribama, kao i u međudomaćinu, što također pridonosi dobivanju novih spoznaja o životnom ciklusu dotičnog parazita (Bartholomew i sur., 1995.). Todd i sur. (1997.) utvrdili su genetsku raznolikost morske uši (*Lepeoptherus salmonis*) utvrđene na divljim i uzgajanim salmonidima, što omogućuje lakše spoznaje o putovima širenja dotičnog parazita.

Iako su gore navedene poglavito riblje bolesti koje su obrađene ovom relativno novom tehnikom, važno je spomenuti da postoje PCR protokoli koji se, s jednakom uspješnošću, primjenjuju i u dijagnostici bolesti školjaka (Marsh i sur., 1995; Stokes i sur., 1995.) i rakova (Lightner i Redman, 1998.).

Princip PCR metode

PCR je metoda koja se osniva na otkrivanju i umnožavanju (amplifikaciji) jedne ili više sekvenci nukleinskih kiselina koje su specifične za porodicu, rod, vrstu, soj ili tip bakterija, virusa, odnosno parazita (Innis i sur., 1990.).

Ukratko, dio nukleinske kiseline koji želimo otkriti i amplificirati određuje se s pomoću parova tzv. »primera«. Primeri su DNA fragmenti sastavljeni od 20–ak nukleotida čiji je redosljed specifičan za određenog uzročnika (virus, bakterija, nametnik). PCR je ciklični postupak koji započinje denaturacijom nukleinskih kiselina ispitivanog uzorka zbog djelovanja temperature od 94 do 97 °C. Zatim se smjesa ohladi na 55 °C, odnosno 72 °C kako bi se primeri mogli vezati za svoje komplementarne sekvence na odvojenim uzvojnica te ih umnožiti, odnosno amplificirati. Taj proces renaturacije naziva se ukrućivanjem (engl. *annealing*), a katalizira ga enzim polimeraza. Ponavljanjem ciklusa zagrijavanja i hlađenja, multiplicira se traženi DNA segment. Za otprilike 1 sat, 20–ak ciklusa PCR-a može amplificirati traženu sekvencu milijun puta. Postupak se obavlja u posebnom, za to opremljenom aparatu (engl. *termocycler*). Broj ciklusa, dužina primjene pojedinih temperatura, kao i trajanje cijeloga procesa, određuju se prema uzorku.

Nakon amplifikacije, uzorak se izloži elektroforezi. Elektroforeza se primjenjuje za odvajanje segmenata amplificiranih u PCR-u. Tijekom elektroforeze dolazi do odvajanja velikih ioniziranih molekula prolaskom kroz gel u električnom polju. Budući da je DNA negativno nabijena, molekule putuju prema anodi različitom brzinom, ovisno o svojoj veličini, odnosno težini. Na taj se način na agaroznom gelu, iz složene mješavine genomskih sekvenci, izdvoji tražena sekvenca (ako zaista postoji u uzorku), u obliku različitih linija (engl. *band*). Slijedi fotografiranje gela uz UV-svjetlo i očitavanje rezultata prema standardima.

Ima nekoliko varijanata PCR tehnike, a neke su od njih »hot-start« tehnika koja podrazumijeva uporabu termostabilnih enzima koji oblažu već postojeće enzime, čime se skraćuje trajanje cijeloga procesa; »touch down« tehnika, koja se primjenjuje kad je u uzorku mnogo DNA, a potrebno je umnožiti samo jedan mali dio, npr. 4 nukleotida; »long-PCR«, kojim se umnožavaju dugački fragmenti, npr. po 400 nukleotida; »in situ PCR«, koji, osim podataka postoji li određena DNA, daje informaciju i gdje se u tkivu nalazi; »nested PCR«, kod kojeg se umjesto gelova rabe uzorci-predlošci, pa se tako izbjegava stvaranje razmaza na gelu i povećava specifičnost metode; »RADP PCR«, koji služi za određivanje genetskih »otisaka prstiju«, jer se amplificira slučajni uzorak; ciklus sekvencioniranja kojim se može umnožavati vrlo mali dio DNA bez potrebe kloniranja gena; »RT-PCR« kojim se detektiraju RNA-virusi (Innis i sur., 1990.).

ZAKLJUČAK

Iz gore navednog može se ustvrditi da je ova tehnika brz i precizan postupak za dobivanje podataka o epizootiološkoj situaciji (npr. dok klasične metode uključuju izolaciju virusa na staničnoj kulturi, odnosno bakterija na hranjivim podlogama kroz nekoliko dana do nekoliko tjedana, PCR–om se to vrijeme skraćuje na 1–3 dana), što omogućuje promptno djelovanje u smislu sprečavanja daljnjeg širenja bolesti primjenom prikladnog liječenja provedbom odgovarajućih sanitarnih mjera. Prednost PCR–a pred ostalim tehnikama očituje se u dobivanju podataka i kada druge metode pokazuju negativan rezultat. Naime, PCR može amplificirati traženu sekvencu nukleinske kiseline bilo kojeg porijekla (virusa, bakterija, nametnika biljaka, životinja ili čovjeka) stotinu, pa i milijun puta unutar nekoliko sati, te se tako mogu otkriti vrlo male količine patogenih uzročnika. Nedostatci metode očituju se u mogućem dobivanju pogrešnih pozitivnih rezultata, što se rješava optimalizacijom PCR–protokola, te prisutnosti raznih inhibitora PCR–a u uzorcima iz okoliša. Premda je učinjen znatan napredak u uklanjanju takvih inhibitora, potrebno je i dalje razvijati metodu za procesiranje svih tipova i vrsta uzoraka okoliša. Prilikom provedbe PCR metode izuzetno je važno voditi računa o apsolutnoj čistoći radnoga prostora, aparata i potrošnog materijala zbog opasnosti od kontaminacije.

No, unatoč tome, dugotrajnijom uporabom metode na određenom području moguće je dobiti precizan uvid u epizootiološku situaciju. Pravodobnim otkrivanjem kliconoštva, sprečavanjem unošenja takvih organizama u kontrolirane uzgoje, kao i točnom determinacijom uzročnika bolesti, mogli bi se smanjiti ekonomski gubici na ribogojilištima nastali zbog uginuća, nepravilne terapije ili čekanja na rezultate klasičnih dijagnostičkih metoda.

Summary

PCR AS DIAGNOSTIC METHOD IN AQUACULTURE

I. Strunjak–Perović, N. Topić Popović*

PCR is an acronym for »polymerase chain reaction«, a technique based on detection and amplification of specific DNA and RNA sequences. It can be applied in diagnostics of hereditary diseases, forensics, population genetics, systematics, bioengineering, evolution biology, and also aquaculture. With this method it is possible to diagnose an array of viral, bacterial and parasitic diseases of fish, shellfish and crustaceans. The advantages of the technique are manifested in rapid obtaining of results, high specificity and sensitivity.

Key words: PCR, diseases, fish, shellfish, crustaceans

* Mr. sc. Ivančica Strunjak–Perović, mr. sc. Natalija Topić Popović, Institut »Ruder Bošković«, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička 54, Zagreb, Hrvatska. e-mail: strunjak@rudjer.irb.hr

LITERATURA

- Andree, K. B., MacConnell, E., Hedrick, R. P. (1998): A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 34 (2), 145–154.
- Argenton, F., De Mas, S., Malocco, D., Dalla Valle, L., Giorgetti, G., Colombo, L. (1996): Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24, 121–127.
- Bartholomew, J. L., Rodriguez R. J., Arakawa, C. K. (1995): Development of a DNA probe for the myxosporean parasite *Ceratomyxa shasta*, using the polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21 (3), 215–220.
- Bernardet, J. F. (1996): Bacterial fish pathogens: Outcome of molecular studies for taxonomy, epidemiology and identification. *Zoological Studies*, 35, (2), 71–77.
- Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M. -K., Singer, J. T., Nicholson, B. L. (1995): Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (4), 835–839.
- Bruchhof, B., Marquardt, O., Enzmann, P. -J. (1995): Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 55, 111–119.
- Colorni, A., Kribb, W., Diamant, A. (1993): Detection and identification of *Mycobacterium marinum* in fish using PCR technique. pp 52. In Baudin Laurencin, F. (ed.) Book of abstracts of the 6th International Conference of the EAAP, Brest, France.
- Covadonga, R. A., Garay, E., Aznar, R. (1995): Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 9, 3476–3478.
- Guillou, J. P., Merle, G., Henault, S., Hattenberger, A. M. (1999): Detection of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by reverse transcription polymerase chain reaction: a step towards diagnostic validation. *Veterinary Research* 20 (1), 49–60.
- Gustafson, C. E., Thomsa, C. J., Trust, T. J. (1992): Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, (12), 3816–3825.
- Havarstein, L. S., Kalland, K. H., Christie, K. E., Endersen, C. (1990): Sequence of the large double-strand RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *Journal of General Virology*, 71, 299–308.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. editor (1990): PCR Protocols. Guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA. 470 pp.
- Lightner, D. V., Redman, R. M. (1998): Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164 (1–4), 201–220.
- Lopez-Lastra, M., Gonzalez, M., Jashes, M., Sandino, A. M. (1994): A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Fish Diseases*, 17 (3), 269–282.

- Magnusson, H. B., Fridjonsson, O. H., Andresson, O. S., Benediktsdottir, E., Gudmundsdottir, S., Andresdottir, V. (1994): *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcription — PCR of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, (12), 4580–4583.
- Marsh, A. G., Gauthier, J. D., Vasta, G. R. (1995): A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology*, 81 (4), 577–583.
- Martinez, I., Espelid, S., Johansen, A., Welsh, M. (1994): Fast identification of species and strains of *Vibrio* by amplification of polymorphic DNA. *Journal of Fish Diseases*, 17, 297–302.
- Novoa, B., Blake, S., Nicholson, B. L., Figueras, A. (1995): Comparison of different procedures for serotyping aquatic birnavirus. *Applied & Environmental Microbiology* 61 (8), 2925–2929.
- Schnitzler, P., Darai, G. (1993): Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus. *Journal of General Virology*, 74, 2143–2150.
- Stokes, N., Siddall, M. E., Burrenson, E. M. (1995): Detection of *Haplosporidium nelsoni* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) in oysters by PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23, 145–152.
- Stone, D. M., Way, K., Dixon, P. F. (1997): Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua*, L.). *Journal of General Virology*, 78, 1319–1326.
- Talaat, A., Reimschuessel, R., Truckis, M. (1997): Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology*, 58, 229–237.
- Tamai, T., Tsujimura, K., Shirahata, S., Oda, H., Noguchi, T., Kusuda, R., Sato, N., Kimura, S., Katakura, Y., Murakami, H. (1997): Development of DNA diagnostic methods for the detection of new fish iridoviral diseases. *Cytotechnology*, 23 (1–3), 211–220.
- Todd, C. D., Walker, A. M., Wolf, K., Northcott, S. J., Walker, A. F., Ritchie, M. G., Hoskins, R., Abbott, R. J., Hazon, N. (1997): Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland — evidence from RAPD markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 210 (2), 251–274.
- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. (1996): Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophata columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology*, 31, (1), 25–31.
- Williams, T., Cory, J. S. (1994): Proposal for a new classification of iridescent viruses. *Journal of General Virology*, 75 (6), 1291–1301.
- Yoshinaka T., Yoshimizu, M., Sawabe, T., Ezura Y. (1997): Detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by reverse transcription (RT) — polymerase chain reaction (PCR). *Fisheries Science*, 63 (4), 592–595.

Primljeno 29. 6. 1999.
Prihvaćeno 20. 10. 1999.