



**விரைவாக மற்றும் நிற மாற்றம் மூலமாக
என்டிரொசைடொஜூன் ஹெப்டொபினெயி (EHP)
நுண்ணுயிரியைக் கண்டறியும் சமவெப்பநிலையில்
மடிப்புகளால் தூண்டப்பட்ட பெருக்கம் (LAMP)
ஆய்வு நெறிமுறை**

**த.சதீஸ்குமார்*, ஜே.ஜோசப் சகாயராஜன், எம்.மகேஷ், எஸ்.வி.அலவன்டி,
கே.கே.விஜயன்**

மத்திய உவ்நீர் மீள்வளர்ப்பு ஆராய்ச்சி நிறுவனம்,
(இந்திய வேளாண்மை ஆராய்ச்சிக்குழுமம்)

75 சாந்தோம் நெடுஞ்சாலை, இராஜா அண்ணாமலைபுரம், சென்னை- 600028.

ஆய்வுச் சுருக்கம்

கணையக் கல்லீரல் மைக்ரோஸ்போரிடியாஸிஸ் (HPM) நோயின் காரணியான என்டிரொசைடொஜூன் ஹெப்டொபினெயி (EHP) எனும் நுண்ணுயிர் ஓட்டுண்ணி ஆசிய நாடுகளில் உள்ள இறால் பண்ணைகளில் பரவலாக பதிவு செய்யப்பட்டுள்ளது. இந்நோய்க்கான தனிப்பட்ட அறிகுறிகள் என எதையும் கூற முடியாது. இந்நோயினால் பாதிக்கப்பட்ட இறால்களில் வளர்ச்சிக் குறைபாடும் குடல்கள் வெண்மை/தங்க நிறமாகவும், வெளியேற்றப்படும் மலம் வெண்மை நிறமாகவும் காணப்படும். பாதிக்கப்பட்ட இறால்களின் மலம் மற்றும் கணையக் கல்லீரல் திசுக்கூறுகளில் நுண்ணோக்கி உதவியுடன் ஸ்போர்களை கண்டறிவதன் மூலம் இந்நோயை உறுதி செய்யலாம். மேலும் சங்கிலித் தொடர்வினை (PCR) எனப்படும் மூலக்கூறு முறையின் மூலமாகவும் கண்டறியலாம். இந்த ஆய்வில் சமவெப்பநிலையில் மடிப்புகளால் தூண்டப்பட்ட பெருக்கம் (லேம்ப்) எனும் கண்டறியும் முறையினால் என்டிரொசைடொஜூன் ஹெப்டொபினெயி (இஹெஸ்பி) மிகவும் விரைவாகவும் (45 நிமிடங்கள்) துல்லியமாகவும் (10 பிரதிகள்) கண்டறியப்பட்டது. இப்பரிசோதனை முறை இறால் பண்ணைகளில் உழவர்களே உபயோகப்படுத்தும் அளவிற்கு மிகவும் எளிய முறை ஆகும்.

தேடுசொற்கள்: என்டிரொசைடொஜூன் ஹெப்டொபினெயி (EHP), லேம்ப் (LAMP) கணையக் கல்லீரல் மைக்ரோஸ்போரிடியாஸிஸ் (HPM), வெள்ளை மல நோய் (WFS)

முன்னுரை

இறால் வளர்ப்பு துறை இந்திய அளவில் உணவு உற்பத்தியிலும் பொருளாதாரத்திலும் முக்கிய பங்கு வகிக்கிறது. ஆனால் நோய்களின் தாக்கம் இறால் வளர்ப்பு துறையில் பெரிய சவாலாக திகழ்கிறது. அண்மையில் இஹெஸ்பி நோயின் தாக்கம் தென்மேற்கு ஆசிய நாடுகளில் உள்ள இறால் பண்ணைகளில் ஈடுகட்ட இயலாத பொருளாதாரச் சீரழிவுகளை ஏற்படுத்தியுள்ளது. (டேங்பரிசிட்டுபாப் ம.கு. 2013, டேங்க் ம.கு. 2015, இராஜேந்திரன் ம.கு. 2016). இந்நோய்க்கான தனிப்பட்ட அறிகுறிகள் என எதையும் கூற இயலாது. இதுவரை இந்நோயினால் பாதிக்கப்பட்ட இறால்கள் வளர்ச்சிக் குறைபாடுடனும், வெண்மை மல நோயுடனும் தொடர்புபடுத்தப் பட்டுள்ளது. இந்நோயின் இலக்கு உறுப்பு இறால் கணையக் கல்லீரல் ஆகும். மேலும் இந்நோய் கிடைமட்ட பரவு முறையில் பரவும். நோய் பரவுதல் மற்றும் தாக்கத்தை கட்டுப்படுத்த நோயினை விரைவாக மற்றும் ஆரம்ப நிலையில் கண்டறிவது மிகவும் அவசியமாகும். தற்போது வரை என்டிரொசைடொஜூன் ஹெபடொபிளெயி நுண்ணுயிரியை கண்டறிய சிறிய துணை ரைபோலோமல் ஆர்என்ஏ (SSURNA) (டேங்பரிசிட்டுபாப் ம.கு. 2013) மரபணு மற்றும் ஸ்போர் சுவரின் (SWP) புரத (ஐரோஎன்லாக் ம.கு. 2016) மரபணுவை இலக்கு செய்யும் சங்கிலி தொடர்புவினை மற்றும் கணநேர சங்கிலி தொடர்புவினை (லையு ம.கு. 2015) மூலமாகவும் கண்டறியலாம்.

இந்த ஆய்வில் சமவெப்பநிலையில் மடிப்புகளால் தூண்டப்பட்ட பெருக்கம் (லேம்ப) என்னும் கண்டறியும் முறையினால் என்டிரொசைடொஜூன் ஹெபடொபிளெயி (இஹெஸ்பி) மிகவும் விரைவாகவும், துல்லியமாகவும் கண்டறியும் முறை விளக்கப்பட்டுள்ளது. இந்த கட்டுரையில் விவரிக்கப்பட்டுள்ள லேம்ப பரிசோதனை முறை எக்கனாது முந்தைய லேம்ப முறையை (சதீஸ்குமார் ம.கு. 2018) காட்டிலும் மேம்பட்ட மற்றும் துல்லியமாக கண்டறியும் முறை ஆகும்.

செயல்முறை

மாதிரிகள் சேகரித்தல்: இந்தியாவில் ஆந்திரப்பிரதேசம் மற்றும் தமிழ்நாட்டில் உள்ள இறால் பண்ணைகளில் 40-91 நாட்கள் வளர்க்கப்பட்ட சராசரி 11 கிராம் எடை கொண்ட பசிபிக் வெள்ளை இறால்களின் மாதிரிகள் சேகரிக்கப்பட்டன. இறால் மாதிரிகள் உலர்ந்த பனிகட்டிகளில் சேகரிக்கப்பட்டு ஆய்வகத்திற்கு கொண்டு வரப்பட்டது. நீர் மாதிரிகள், சாதாரண மலச் சரங்கள் மற்றும் வெள்ளை மலச் சரங்கள் பனிகட்டிகளில் சேகரிக்கப்பட்டு ஆய்வகத்திற்கு கொண்டு வரப்பட்டது (படம் 1).

டிஎன்ஏ பிரித்தெடுத்தல்: இராஜேந்திரன் ம.கு. 2016இன் நெறிமுறைப்படி இறால்களின் கணையக் கல்லீரல் மற்றும் மல மாதிரிகளில் இருந்து மரபணு டிஎன்ஏ பிரித்தெடுக்கப்பட்டது. டிஎன்ஏ பிரித்தெடுக்கப்பட்ட பின்னர் -20°C பாதுகாக்கப்பட்டது.

லேம்ப் பிரைமர் வடிவமைத்தல் மற்றும் லேம்ப் நெறிமுறை விவரங்கள்

பிரைமர் எக்ஸ்ப்ளோரர் பதிப்பு 5 எனும் ஆன்லைன் மென்பொருளை பயன்படுத்தி லேம்ப் பிரைமர்கள் வடிவமைக்கப்பட்டன. வடிவமைக்கப்பட்ட லேம்ப் பிரைமர்கள் பெங்களூரில் உள்ள இரோபின்ஸ் நிறுவனத்தில் உருவகிக்கப்பட்டது. இந்த லேம்ப் சோதனை 25µl பரிசோதனை கலவையில் செயல்படுத்தப்பட்டது. இந்த பரிசோதனை கலவையில் 2.5µl தெர்மோ போல்

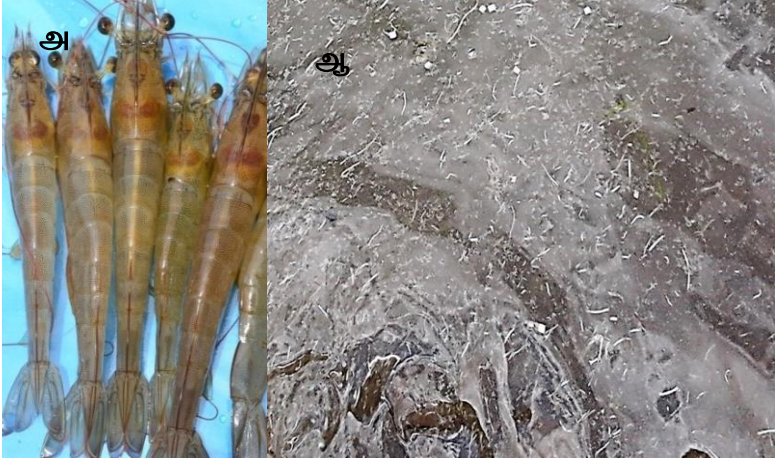
தாங்கல் (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100; pH 8.8 @ 25°C) 1.5 µl 6 mM MgSO₄, 3.5 µl 10 mM நியூக்ளியோடைட்களின் (dNTP) கலவை 1.6 µM முன்னோக்கு உள் மற்றும் 1.6 µM பின்னோக்கு உள் பிரைமர்களும் 0.2 µM F3 மற்றும் B3 பிரைமர்களும் 0.4 µM முன்னோக்கு மடிப்பு மற்றும் பின்னோக்கு மடிப்பு பிரைமர்களும், 1 µl 320 U ml⁻¹ பிஎஸ்டி டிஎன்ஏ பாலிமரேஸும் (நியூ இங்கிலாந்து பயோலேப்.), 1 µl டெம்ப்லேட்டும் (100 ng) எதிர்மறை எதிர்வினை தவிர்த்து சேர்க்கப்பட்டு செயல்படுத்தப்பட்டது. இந்த லேம்ப் சோதனை வெவ்வேறு தூண்டுதல் வெப்பநிலைகளான 60°செல்சியஸ், 63°செல்சியஸ், 65°செல்சியஸ் மற்றும் வேறுபட்ட எதிர்வினை நேரங்களான 30, 45 மற்றும் 60 நிமிடங்களில் நிகழ்த்தப்பட்டு தொடர்ந்து 80°செல்சியஸ் இல் 5 நிமிடங்கள் டிரை பாத்தில் (இகிவ்டரான், மெடிகா உபகரணங்கள், மும்பை) வைக்கப்பட்டு எதிர்வினை நிறுத்தப்பட்டது.

முடிவுகள் மற்றும் விளக்கவுரை

உலகளவில் இறால் வளர்ப்பில் இஹெச்பி நுண்ணுயிரியின் தாக்கம் தீவிர அச்சுறுத்தலாக விளங்குகிறது. இஹெச்பி நுண்ணுயிரியின் தொற்று இறால்களில் திரளான இறப்பினை ஏற்படுத்துவதில்லை. மாறாக வளர்ச்சிக் குறைபாடுகளை உண்டாக்குவதன் மூலம் கடுமையான பொருளாதார இழப்புகளை ஏற்படுத்துகிறது. ஆகையால் இந்நோயினை ஆரம்ப காலகட்டத்தில் கண்டறிவது மிகவும் அவசியமாகும். இந்த படிப்பினையில் சமவெப்பநிலையில் மடிப்புகளால் தூண்டப்பட்ட பெருக்கம் (லேம்ப்) எனும் கண்டறியும் முறையினால் என்டிரொசைடொஜூன் ஹெர்படொபினெயி மிகவும் விரைவாகவும் துல்லியமாகவும் கண்டறியும் முறை விவரிக்கப்பட்டுள்ளது.

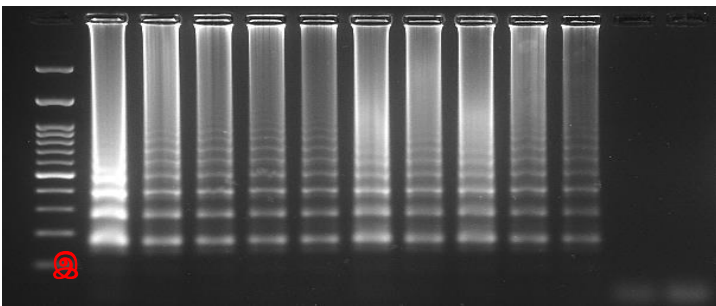
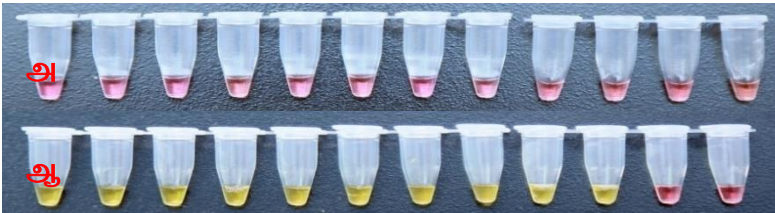
லேம்ப் பரிசோதனையின் முடிவுகள் நிற மாற்றத்தின் மூலமாகவும் அகரோஸ் ஜெல் மின்னாற்பகுப்பு மூலமாகவும் கண்டறியப்பட்டது. எதிர்மறை மாதிரிகள் நிறமாற்றத்தில் இளஞ்சிவப்பு நிறமாகவும் நேர்மறை மாதிரிகள் மஞ்சள் நிறமாகவும் மாறும். அகரோஸ் ஜெல் மின்னாற்பகுப்பில் நேர்மறை மாதிரிகள் ஏணி போன்ற பட்டைகளை உருவாக்கும். எதிர்மறை மாதிரிகள் பட்டைகள் எதையும் உருவாக்காது. இந்த லேம்ப் சோதனை வெவ்வேறு தூண்டுதல் வெப்ப நிலைகளான 60° செல்சியஸ், 63° செல்சியஸ், 65° செல்சியஸ் மற்றும் வேறுபட்ட எதிர்வினை நேரங்களான 30, 45 மற்றும் 60 நிமிடங்களில் நிகழ்த்தப்பட்டது. அவைகளில் 60°செல்சியஸ் மற்றும் 45 நிமிடங்கள் சரியான முடிவுகளை வழங்கியதால் முறையே உகந்த தூண்டுதல் வெப்பநிலையாகவும் மற்றும் எதிர்வினை நேரமாகவும் தேர்ந்தெடுக்கப்பட்டது. இந்த லேம்ப் நெறிமுறையின் துல்லியத்தை சோதனை செய்ய பத்து மடங்கு தொடர் நிர்த்தல் செய்யப்பட்ட இஹெச்பி பிலாஸ்மிட் டிஎன்ஏ உபயோகப்படுத்தப்பட்டது. இதன் மூலம் இந்த லேம்ப் நெறிமுறையின் துல்லியம் பத்து மரபணு டிஎன்ஏ பிரதிகள் என கண்டறியப்பட்டது (படம் 2).

இந்த லேம்ப் நெறிமுறை பாலிமரேஸ் சங்கிலி தொடர் வினையை ஒப்பிடும்போது மிகவும் விரைவாக 45 நிமிடங்களுக்குள் இஹெச்பி நுண்ணுயிரியினை கண்டறியவல்லது. மேலும் இந்த நெறிமுறையின் துல்லியம் சீராக பத்து இஹெச்பி மரபணு டிஎன்ஏ பிரதிகளை கண்டறியவல்லது. இந்த லேம்ப் முறையின் முடிவுகளை எளிய முறையில் நிறம் மாற்றத்தின் மூலமாக கண்டறிய முடியும். இம்முறையை செயல்படுத்த விலையுயர்ந்த உபகரணங்கள் தேவையில்லை. சாதாரண சிறிய டிரை பாத் போதுமானதாகும்.



படம் 1. அ. பாதிக்கப்பட்ட இறால்கள் வெள்ளை குடல்களுடன் காணப்பட்டது. ஆ. பாதிக்கப்பட்ட இறால் குளம் மிதக்கும் வெள்ளை மலச் சரங்களுடன் காணப்பட்டது.

1×10^{10} 1×10^9 1×10^8 1×10^7 1×10^6 1×10^5 1×10^4 1×10^3 1×10



படம் 2. பத்து மடங்கு தொடர் நீர்த்தல் செய்யப்பட்ட இறேச்சி பிலாஸ்மிட் டிஎன்ஏ. எம்- எதிர்முறை மாதிரி. அ. லேம்ப் நெறிமுறைக்கு முன்னருள்ள நிறம், ஆ. லேம்ப் நெறிமுறைக்கு பின்னருள்ள நிறம், இ.லேம்ப் நெறிமுறையின் ஜெல் மின்னாற்பகுப்பு.

முடிவுரை

மேலும் இந்த லேம்ப் பரிசோதனை முறை எங்களது முந்தைய லேம்ப் பரிசோதனை முறையைக் காட்டிலும் மேம்பட்ட மற்றும் துல்லியமாக கண்டறியும் முறை ஆகும். ஆகையால் இந்த விரைவான, துல்லியமான மற்றும் நிறம் மூலம் கண்டறியும் லேம்ப் நெறிமுறை இறால் பண்ணைகளில் வைத்து உழவர்களே பயன்படுத்தும் அளவிற்கு மிகவும் எளிய முறையாகும்.

மேற்கோள்கள்

- Jaroenlak P, Sanguanrut P, Williams BAP, Stentiford GD, Flegel TW, Sritunyalucksana K, Itsathitphaisarn O (2016). A Nested PCR Assay to Avoid False Positive Detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Environmental Samples in Shrimp Farms. *PLOS ONE*, 11(11), e0166320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166320>
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY., Huang J (2015). Development of real-time PCR assay for detection of microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and detection in shrimp samples under different growth rates. *Fish. Sci.* (in Press Chinese, English Abstr).
- Rajendran KV, Shiyam S, Ezhil Praveena P, Joseph Sahaya Rajan J, Sathish Kumar T et al (2016). Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* in India. *Aquaculture*, 454, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.034>
- Sathish kumar, T., Navaneetha Krishnan, Joseph sahaya rajan, M Makesh, K P Jithendran, S. V. Alavandi, & K.K Vijayan (2018). Visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid diagnosis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Parasitology Research*, 117(5), 1485–1493.