نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۸، بهار ۱۳۹۲

گزارش *Anaplasma centrale* سویه آموری در گاوهای ایران

• **وحید نعمان** (نویسنده مسئول)
بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، اصفهان، ایران.
تاریخ‌دریافت: دی ماه ۱۳۹۰ تاریخ‌پذیرش: آبان ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۳۲۸۹۷۱۴
Email: vnoaman@gmail.com

چکیده

۱۵۰ نمونه خون از گاوها در منطقه ای از اصفهان تهیه شد.DNA استخراجی از نمونه های خونی توسط آغازگر اختصاصی *A. centrale* سویه آموری که بر اساس ژن ۱۶S rRNA طراحی شده بود با روش Nested-PCR مورد بررسی قرار گرفت. گسترش های خونی از نظر *A. centrale* منفی بودند. نتایج نشان می دهند که از ۱۵۰ نمونه مورد آزمایش با پرایمر اختصاصی *A. centrale* سویه آموری ۲ نمونه (۱/۳۳درصد) مثبت بودند. این گزارش اولین تشخیص ملکولی *A. centrale* سویه آموری در گاوهای ایران است.

کلمات کلیدی: *Anaplasma centrale* سویه آموری، Nested-PCR، ۱۶S rRNA gene ، گاو، ایران

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 98 pp: 26-29

Report of *Anaplasma centrale* (Amori strain) in cattle in Iran

By: Noaman, V. Department of Veterinary Research, Isfahan Research Center for Agriculture and Natural Resources, Isfahan, Iran. (Corresponding Author; Tel: +989133289714)

Received: February 2011 **Accepted: November 2012**

One hundred and fifty blood samples were prepared from cattle of a region in Isfahan. The extracted DNA from blood cells were analyzed by *A. centrale* (Amori strain) specific Nested-PCR using primers derived from 16S rRNA gene. All blood smears were negative for *A. centrale* like structures. The results showed that 2 of total 150 blood samples (1.33%) were *A. centrale* (Amori strain) positive by specific primers based on 16S rRNA gene. This report is the first molecular detection of *A. centrale* (Amori strain) from cattle in Iran.

Key words: *Anaplasma centrale* (Amori strain), 16S rRNA gene, Nested-PCR, cattle, Iran

مقدمه

آناپلاسموز یکی از بیماری های گاو است که از طریق کنه منتقل شده و توسط اجرام ریکتزیایی درون گویچه ای از جنس آناپلاسما ایجاد می شود (۹). Theiler در سال های ۱۹۱۰ و ۱۹۱۱ در آفریقای جنوبی برای اولین بار بر اساس محل قرار گرفتن باکتری در گویچه های قرمز گاو دو گونه *A. marginale* و *A. centrale* را توصیف نمود. او مشاهده نمود که *A. centrale* (سویه آفریقای جنوبی) بیماریزایی کمتری نسبت به *A. marginale* برای گاو دارد و در گاوهای آلوده با *A.centrale* ایمنی محافظتی در برابر عفونت با *A. marginale* ایجاد می شود (۱۰، ۱۱).

Inokuma و همکاران در سال ۱۹۹۱ *A. centrale* سویه آموری[1] را در گاوهای ژاپن شناسایی کردند و براساس مطالعات انجام شده مشخص شد که این سویه مستقل از دیگر گونه ها است و اطلاعات ردیف نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغیر V۱ ژن ۱۶S rRNA این سویه با سویه آفریقای جنوبی و دیگر گونه ها متفاوت است بطوری که می توان آغازگری طراحی کرد که بتواند اختصاصاً *A. centrale* سویه آموری را تکثیر نماید (۴).

در ایران شناسایی آناپلاسموز از طریق گسترش های خونی رنگ آمیزی شده با گیمسا صورت می گیرد و محل استقرار انگل در گلبول قرمز جهت تعیین گونه آناپلاسما ملاک تشخیص می باشد. از آنجا که هیچ گونه گزارشی در خصوص حضور *A. centrale* در گاوهای ایران وجود ندارد و آناپلاسموز گاوی محدود به *A. marginale* می باشد، لذا این تحقیق با هدف تشخیص سویه های *A. centrale* بر اساس ژن ۱۶S rRNA برای اولین بار در ایران انجام شد.

مواد و روش ها

در مجموع ۱۵۰ نمونه خون از ۳۰ دامداری نیمه صنعتی انتخاب شد. در هر دامداری بطور تصادفی از ۵ راس دام ۵ میلی لیتر خون از ورید وداج اخذ و در لوله های حاوی ماده نگهدارنده (اتانول ۷۰درصد) جمع آوری شد. علاوه بر این از هر دام ۲ گسترش خونی نازک نیز تهیه شد که پس از خشک شدن و کدگذاری به آزمایشگاه انگل شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان ارسال شدند. اطلاعات دام شامل نام دامدار، منطقه، روستا، تعداد دام، کد دام، سابقه بیماری در گله، سن، گونه و جنس ثبت شدند. در آزمایشگاه لام های خونی با محلول گیمسا رنگ آمیزی شدند و با درشتنمایی ۱۰۰۰ برابر میکروسکوپ نوری گلبول های قرمز (۱۰۰ فیلد میکروسکوپی) از نظر وجود *A. centrale* مورد بررسی و جستجو قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنوم انگل از نمونه های خون با استفاده از کیت استخراج MBST, Iran (DNA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. PCR و Nested PCR اولیه جهت تشخیص جنس آناپلاسما با استفاده از مطالعات قبلی انجام گرفت (۵). تکثیر *A. centrale* سویه آموری با استفاده از زوج آغازگر P۵/P۴ انجام گرفت (جدول۱). محصول Nested PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، اندازه قطعه تکثیر یافته در مقایسه با مارکر مشخص شد. جهت تشخیص *A. centrale* سویه آفریقای جنوبی از روش PCR-RFLP استفاده شد(۵). از آنجا که توالی GCG تنها در قسمت بسیار متغیر V۱ از ژن *A. centrale* ۱۶S rRNA سویه آفریقای جنوبی وجود دارد، پس از انکوباسیون نمونه با آنزیم به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در صورت وجود *A. centrale* سویه آفریقای جنوبی آنزیم اندونوکلئاز MvnI دو قطعه با اندازه های bp۶۶ و bp۵۴ تولید می کند.

نتایج

در بررسی گلبول های قرمز گسترش های خونی هیچ گونه گنجیدگی در مرکز گلبول های قرمز مشاهده نگردید.

در ۲ نمونه از ۱۵۰ نمونه خون (۱/۳۳درصد)، علاوه بر تکثیر اولیه با آغازگرهای جنس آناپلاسما، باند *A. centrale* سویه آموری (۵۱۳ bp) نیز مشاهده شد (شکل الف-۱). درآزمون RFLP تمامی ۱۵۰ نمونه مورد آزمایش از نظر آلودگی به سویه آفریقای جنوبی *A. centrale* منفی بودند (شکل ب-۱).

بحث

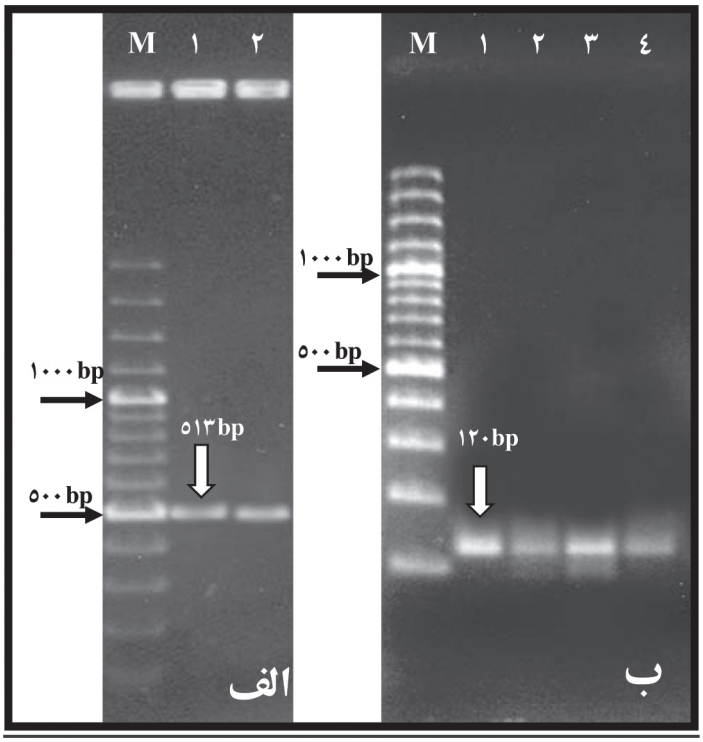
Inokuma و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثبات کردند که *A. centrale* سـویه آموری مستقل از دیگر گونه ها است. *A. centrale* سویه آموری با *A. marginale* در ۲۴-۲۱ نوکلئوتید از ژن ۱۶S rRNA با یکدیگر تفاوت دارند (۴).

در بررسـی حاضـر در ۱/۳۳درصد از نمونه ها ژنـوم *A. centrale* سـویه آموری تکثیر شـد. در حالی که نشـانه های بالینی در گاوانی که مثبت بودند، مشـاهده نشـد. این تحقیق اولین گزارش تشخیص ملکولی *A. centrale* سویه آموری در گاوهای ایران است.

Theiler در سـال ۱۹۱۱ سـویه آفریقـای جنوبـی *A. centrale* را توصیـف کرد کـه باعث کم خونی ملایـم و بیماری تحـت کلینیکی می شـد ولی Ceci و همکاران در سـال ۲۰۰۸ آناپلاسموز حاد ناشی از سویه *A. centrale* را درجنوب ایتالیا گزارش نمودند (۲). سویهٔ آفریقای جنوبی *A. centrale* علاوه بر کشـورهای آفریقایی در استرالیا، اسرائیل و آمریکای لاتین به عنوان واکسـن زنده علیه *A. marginale* اسـتفاده می شـود (۷، ۸) و متعاقب واکسیناسـیون گاوهای واکسـینه شـده به عفونت پایدار مبتلا می شـوند (۱). توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA *A. centrale* سـویه آفریقـای جنوبی، در ۱۰-۹ نوکلئوتید نسـبت به *A. marginale* تفـاوت دارد (۳). درآزمـون RFLP در هیـچ یک از نمونه های مورد آزمایش آلودگی با سویه آفریقای جنوبی *A. centrale* دیده نشد. با توجه به اینکه در ایران واکسن مصرف نمی شود عدم حضور این گونه در ایران دور از ذهن نمی باشد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای تکثیرکننده *A. centrala* سویه آموری

منبع	اندازه قطعه تکثیری(جفت باز)	موقعیت آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	شماره دسترسی	آغازگر	تشخیص
۳	۵۱۳	۵۶-۸۶	۵'caaatctgtagcttgctacgga۳`	AF۲۸۳۰۰	P۵	*A. centrale*
		۵۵۸-۵۷۷	۵'gttaagccctggtatttcac۳'	M۶۰۳۱۳	P۴	سویه آموری



شکل ۱- الف) ۱ و ۲ نمونه های PCR اولیه و تکثیر شده با آغازگر اختصاصی *A. centrale* سویه آموری) محصول۵۱۳bp، ب) جهت شناسایی *A. centrale* سویه آفریقای جنوبی محصول ۱۲۰ bp تحت تاثیر آنزیم FunD II(MvnI) قرار گرفته ولی بریده نشده(۴ ،۲)، M: مارکر ۱۰۰ bp

پاورقی

1- Amori

منابع مورد استفاده

1- Aubry, P. Geale, DW. (2010) A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary Emerg. Dis*. 58: 1–30.

2- Ceci, L., Decaro, N., Lorusso, E., Paradies, P., Elia, G., Martella, V., Buonavoglia, C., Carelli, G. (2008) *First report of bovine anaplasmosis by Anaplasma centrale in Europe*, molecular identification and phylogenetic analysis. Vet. Res. Commun. 32 (Suppl 1):S263–S266.

3- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., Brouqui, P. (2001) Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. Clin. Diagn. Lab. *Immunol*. 8(2):241-4.

4- Lew, AF., Gale, KR., Minchin, CM., Shkap, V., de Waal, V. (2003) Phylogenetic analysis of the erythrocytic Anaplasma species based on 16S rDNA and GroEl (HSP60) sequences of *A. marginale, A. centrale,* and *A. ovis* and the specific detection of A. centrale vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 20:145-160.

5- Noaman, V., Shayan, P., Amininia, N. (2009) Molecular diagnostic of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *I.J.Parasitol.* 4(1): 31-38.

6- Scoles, GA., Goff, WL., Lysy, TJ., Lewis, GS., Knowles, DP. (2008) Validation of an *Anaplasma marginale* cELISA for use in the diagnosis of *A. ovis* infections in domestic sheep and Anaplasma spp. in wild ungulates.*Vet. Microbiol.* 130: 184–190.

7- Shkap, V., Kocan, KM., Molad, T., Mazuz, M., Leibovich, B., Krigel, Y., Michoytchenko, A., Blouin, E., de la Fuente, J., Samish, M., Mtshali, M., Zweygarth, E., Fleiderovich, EL., Fish, L. (2009) Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A.centrale* vaccine strain by Hyalomma excavatum, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. *Vet. Microbiol*. 134(3-4): 254-60.

8- Shkap, V., Pipano, E., McGuire, TC., Palmer, GH. (1991) Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol*. *Immunopathol*. 29:31-40.

9- Ristic, M. Kreier, JP. (1984) *Family III. Anaplasmataceae Philip* 1957. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Krieg N.R. & Holt J.G., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 719-729.

10- Theiler, A. (1910) *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). *The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease,* p. 7-64. In A. Theiler (ed.), Report of the government veterinary bacteriologist, 1908-9. Transvaal, South Africa.

11- Theiler, A. (1911) *Further investigations into anaplasmosis of South African cattle*, p. 7-46. In 1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa.