DOI: 10.22092/vj.2019.127506.1611
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تشخیص مولکولی و میکروسکوپی گونه‌های آناپلاسما در شترهای کشتار شده در استان گلستان

• پرستو پورغفور لنگرودی (نویسنده مسئول)
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۶-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۸-۰۹
Email: poorghafoor@yahoo.com

چکیده

آناپلاسما میکروارگانیسم درون سلولی اجباری است که در سلول‌های خونی میزبان زندگی می‌کند و منجر به بیماری و تحمیل هزینه‌های مراقبتی زیادی می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی مولکولی و میکروسکوپی حضور جنس و گونه‌های آناپلاسما در شترهای استان گلستان بود. نمونه‌های خون از شترهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی اینچه برون برای مدت دو سال جمع‌آوری شد. بررسی میکروسکوپی با تهیه گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا صورت گرفت. آزمون مولکولی با تکثیر اولیه قطعات DNA و تأیید آن‌ها با انجام nested-PCR صورت گرفت. از پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن‌های 16S rRNA و msp4 برای تکثیر گونه‌های مختلف آناپلاسما استفاده شد. قطعات تکثیری حاصل از PCR اولیه و nested-PCR حضور جنس آناپلاسما در ۳۳ نمونه از ۹۰ نمونه (۳۶/۶۷ درصد) را مثبت نشان داد. در میان نمونه‌های حاوی جنس آناپلاسما، ۲/۲۲ درصد، ۲۲/۲۲ درصد و ۱۳/۳۳ درصد با PCR اختصاصی به‌ترتیب گونه‌های آناپلاسما مارجیناله، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم و آناپلاسما بویس شناسایی شدند. هیچ کدام از نمونه‌ها با PCR اختصاصی حضور گونه آناپلاسما سنتراله را نشان ندادند. مشاهده میکروسکوپی اجرام آناپلاسمایی درون گلبول‌های قرمز حاکی از حضور جنس آناپلاسما در ۳۳/۳۳ درصد از گسترش‌های خونی بود. با مقایسه آزمون مولکولی و میکروسکوپی حساسیت، اختصاصیت و صحت برای شناسایی جنس آناپلاسما به‌ترتیب ۲۱/۲۱ درصد، ۶۶/۶۷ درصد و ۵۰ درصد بدست آمد. نتایج مطالعه حاکی از حضور آناپلاسما در میان شترهای کشتار شده در استان گلستان بود. بر طبق نتایج، بررسی مولکولی آناپلاسما نتایج دقیق‌تری نسبت به بررسی میکروسکوپی بدست می‌دهد.

کلمات کلیدی: آناپلاسما، ژن 16S rRNA، ژن msp4، گسترش خونی، گلستان

Veterinary Researches & Biological Products No 128 pp: 41-50

Molecular and microscopy detection of Anaplasma species in camel of Golestan province

By: Poorghafoor Langeroodi, P., (Corresponding Author) Member of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-08-25 Accepted: 2019-10-31

Email: poorghafoor@yahoo.com

Anaplasma is an intracellular microorganism that lives in blood cells of host, causing illness and impose care costs. This study was aimed to investigate molecular and microscopic presence of genus and Anaplasma species in camels of Golestan province. Blood samples were collected from adult slaughtered camels in Inche Bourun industrial slaughterhouse for two years. Microscopic examination was performed by preparing Giemsa-stained blood smear. Molecular test was performed by primary amplification of DNA fragments and then they confirmed by performing the nested-PCR. The specific primers of 16S rRNA and msp4 genes were used to detect different species of Anaplasma. The proliferation of the primary and the nested PCR products showed that genus Anaplasma in 33 out of 90 samples (36.37 percent) were positive. Among samples including Anaplasma 2.22, 22,22 and 13.33 percentage were detected by specific PCR for A. marginale, A. phagocytophilum and A. bovis, respectively. None of the samples showed the presence of Anaplasma centrale. Microscopic observation of anaplasmic bodies in red blood cells (RBC) indicated the presence of Anaplasma genus in 33.33 percent of blood smears. By comparing molecular and microscopic tests, the sensitivity, specificity and accuracy to identify the genus Anaplasma were 21.21, 66.67 and 50 percent, respectively. The results of this study showed that Anaplasma was present among camels in Golestan province. According to the results, molecular study of Anaplasma yields more accurate results than microscopic examination.

Keywords: Anaplama, 16S rRNA gene, msp4 gene, Blood smear, Golestan

مقدمه

آناپلاسما میکروارگانیسم درون سلولی اجباری است که در سلول‌های خونی میزبان زندگی می‌کند و منجر به بیماری و تحمیل هزینه‌های مراقبتی زیادی می‌شود. آناپلاسما در خانواده آناپلاسماتاسه‌آ (Anaplasmataceae) و راسته ریکتزیاله (Rickettsiae) طبقه‌بندی شده است (۸, ۲۱). بر طبق آخرین طبقه‌بندی در نشخوارکنندگان، آناپلاسما شامل گونه‌های آناپلاسما مارجیناله (A. marginale)، آناپلاسما سنتراله (A. central)، آناپلاسما اوویس (A. ovis)، آناپلاسما بوویس (A. bovis)، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم (A. phagocytophilum) و آناپلاسما پلاتیس (A. platys) می‌باشد (۱۷). پستانداران به‌ویژه انسان و دام میزبان گونه‌های مختلف این میکروارگانیسم هستند که برخی بیماری‌زا و برخی فاقد قدرت بیماری‌زایی هستند. آناپلاسموزیس از جمله بیماری‌های ناشی از گونه آناپلاسما است. درگیری دام با آناپلاسموزیس گذشته از هزینه‌های سنگین مراقبت دامپزشکی، باعث عوارض دیگری از جمله کاهش وزن بدن، کم‌خونی، کاهش تولید شیر و حتی مرگ میزبان می‌گردد (۱۶, ۱۷). شیوع بیماری آناپلاسموزیس از طریق دام آلوده، حشرات گزنده، اشیاء آلوده به خون و کنه‌ها صورت می‌گیرد که مورد آخر مهم‌ترین و فراوان‌ترین روش انتقال بیماری است (۱۶, ۱۷).

جهت تشخیص گونه‌های مختلف آناپلاسما از روش‌های میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی با گیمسا و موقعیت‌یابی گنجیدگی‌ها در حاشیه یا در مرکز گلبول‌های قرمز (۱۹) و یا روش‌های مولکولی با ردیابی توالی اختصاصی هر گونه در بین توالی DNA استخراج شده از میزبان آلوده استفاده می‌شود. رنگ‌آمیزی گسترش خونی در تشخیص میزبان آلوده به آناپلاسما با علائم حاد مناسب است اما از شناسایی فرد حامل یا بیمار مزمن ناتوان است (۶).

باتوجه به بیماری‌زایی برخی گونه‌های آناپلاسما و هزینه‌های مراقبتی دام‌های بیمار و ضررهای اقتصادی ناشی از تلفات دام بررسی میزان شیوع آن در هر منطقه بسیار حائز اهمیت است. در ایران شیوع گونه‌های مختلف آناپلاسما در گاو (۲۶, ۲۷, ۲۹) و گوسفند (۲۶, ۲۸, ۲۹) مورد بررسی قرار گرفته است در حالی‌که درگیری این بیماری در شترهای مناطق مختلف کشور بسیار کم پرداخته شده است (۱۱, ۳۴). تاکنون شیوع آناپلاسما در استان‌های جنوبی (۱۱, ۳۴) و استان‌های شمال شرقی (۱۲) بررسی شده است.

شتر بنا به شرایط آب و هوایی و شیوه زندگی مردم نوار مرزی استان گلستان به طور ویژه در منطقه ترکمن صحرا یافت می‌شود. طی ۱۰ سال اخیر جمعیت شترهای این استان افزایش پیدا کرده و از ۴ هزار نفر به ۷۵۰۰ نفر رسیده است (۳۳). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی و تفریق گونه‌های مختلف آناپلاسما در شترهای پراکنده در استان گلستان صورت نگرفته است، هدف مطالعه حاضر بررسی میکروسکوپی و مولکولی گونه‌های مختلف این میکروارگانیسم در شترهای کشتار شده در استان گلستان و

مقایسه نتایج آزمون میکروسکوپی و مولکولی در تشخیص بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌کار

جمع‌آوری نمونه

مطالعه حاضر در استان گلستان، شمال ایران صورت گرفت. استان گلستان با مساحت ۲۰۴۳۸ کیلومتر مربع بین طول شرقی۵۳,۵۱-۵۶,۲۲ و عرض شمالی ۳۸,۸-۳۶,۳۰ واقع گردیده است. در این مطالعه از شترهای بالغ کشتار شده در کشتارگاه صنعتی اینچه برون گرگان جهت نمونه‌برداری استفاده شد. کشتارگاه اینچه‌برون، تنها کشتارگاه صنعتی دام در استان گلستان است و اکثر شترهای استان در این کشتارگاه کشتار می‌شوند. نمونه‌برداری خون در مدت دو سال انجام شد.

تعیین اندازه نمونه

اندازه نمونه براساس فرمول پیشنهادی مارتین و همکاران (۲۰) با روش نمونه‌گیری تصادفی محاسبه گردید.

$$n = \frac{Z^2_{(1-\frac{\alpha}{2})} P(1-P)}{d^2}$$

در فرمول بالا؛ n: اندازه نمونه مورد نیاز، P: احتمال وقوع، Z: مقدار توزیع Z (۱/۹۶ برای سطح معنی‌داری ۵ درصد) و d: دقت آزمون می‌باشد. با توجه به اطلاعات قبلی بر روی شتر (۱۱, ۳۴)، اگر احتمال آلودگی (P) برابر با ۶٪ و دقت (d) پنج درصد در نظر گرفته شود، تعداد نمونه ۸۶ خواهد شد که به تعداد ۱۰۰ نمونه افزایش یافت.

نحوه نمونه‌گیری خون

از ورید وداج هر شتر ۵ میلی لیتر خون اخذ شد و به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA منتقل گردید. نمونه‌های خون برای تهیه گسترش‌های خونی جهت بررسی میکروسکوپی گونه‌های آناپلاسما استفاده شد و بقیه نمونه خون جهت آزمون مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آزمون میکروسکوپی

از هر نفر شتر یک گسترش خونی تهیه شد و با استفاده از متانول خالص به مدت ۵ دقیقه ثابت شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه با محلول گیمسا (۵ درصد رقت ۱ به ۱۰ از محلول آماده) رنگ‌آمیزی شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از روغن سدر و عدسی ۱۰۰۰ میکروسکوپ (نیکون، X۱۰۰۰، ژاپن) مورد بررسی و جستجو قرار گرفتند و حداقل ۱۰۰ فیلد میکروسکوپی از نظر حضور اجسام آناپلاسمایی در گلبول‌های قرمز مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه آزمون میکروسکوپی در فرم مربوط به هر نمونه ثبت شد.

آزمون مولکولی

پس از ذوب شدن نمونه‌های خون که در فریزر۲۰- نگهداری شده بودند، استخراج DNA از هر نمونه با استفاده از کیت استخراج شرکت MBST (ایران) طبق دستورالعمل سازنده صورت گرفت. کیفیت سنجی و غلظت سنجی نمونه‌های استخراجی با ژل آگارز و اسپکتروفتومتر بررسی شد. پس از استخراج و بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی، تکثیر قطعات DNA با استفاده از واکنش‌های زنجیره پلی‌مراز صورت گرفت. ابتدا PCR اولیه جهت تشخیص جنس آناپلاسما بدون در نظر داشتن گونه خاصی انجام شد. بدین منظور جفت پرایمرهایی استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن‌ها در اکثر گونه‌های آناپلاسما وجود دارد. محصول تکثیری این جفت پرایمرها دربرگیرنده قطعه بسیار متغیر V۱ از ژن ۱۶S rRNA

جدول ۱- مواد مورد استفاده در تکثیر نمونه های DNA و یا محصول PCR اولیه.

ماده	PCR اولیه با استفاده از DNA	nested-PCR با استفاده از PCR اولیه
نمونه	µ l۲/۵ DNA	اولیه PCR ۰/۵ محصول µ
بافرTaq PCR (۱۰X)	µ ۲/۵	µ ۲
(MgCl۵۰) ۲ mM	µ ۰/۷۵	µ ۰/۶
dNTP (۱۰ هر کدام mM)	µ ۰/۵	µ ۰/۴
پرایمر رفت (Forward) و برگشت (Reverse) (۲۰ µM)	µ ۰/۵	µ ۰/۴
Taq DNA polymerase (۵U/µl)	µ ۰/۱۲۵	µ ۰/۱
آب فاقد یون	µ ۱۷/۶۲۵	µ ۱۵/۶
حجم نهایی	µ ۲۵	µ ۲۰

و قطعه ۸۶۶ جفت بازی از ژن msp۴ بود. سپس جهت تأیید نمونه تکثیر شده از دو پرایمر در وسط پرایمرهای اولیه استفاده شد (nested-PCR) که تأییدکننده PCR اولیه بود. برای تکثیر سه گونه آناپلاسما سنتراله، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم و آناپلاسما بوویس از پرایمرهای اختصاصی بر طبق توالی ژن *16S* rRNA استفاده شد. با توجه به اینکه نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغیر V۱ ژن 16S rRNA در آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما اوویس دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای نمی‌باشند، برای تکثیر دو گونه فوق از پرایمرهای اختصاصی بر طبق توالی ژن msp4 استفاده شد. مواد واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) بسته به نوع ماده ژنتیکی مورد استفاده در حجم نهایی ۲۵ یا ۲۰ میکرولیتر ترکیب شدند (جدول ۱). محصول PCR نمونه‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای گونه‌های مختلف آناپلاسما مورد تکثیر قرار گرفت (جدول ۲). جهت تکثیر قطعات حاصل از نمونه DNA یا محصول اولیه PCR، از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad T۱۰۰) استفاده شد. برنامه PCR شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵-۴۰ چرخه دمایی با دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد (بسته به گونه آناپلاسما) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. دمای اتصال برای انجام PCR اولیه ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود. دمای اتصال برای انجام nested-PCR و همچنین تکثیر قطعات در جنس آناپلاسما، ۵۶ درجه سانتی‌گراد بود. دمای اتصال برای تکثیر قطعات در سه گونه گونه آناپلاسما سنتراله، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم و آناپلاسما بوویس، ۵۸ درجه سانتی‌گراد و برای دو گونه آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما اوویس، ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. در همه نمونه‌ها کنترل منفی (حاوی آب مقطر) و کنترل مثبت (حاوی آناپلاسما مارجیناله) استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد و جهت رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ l/mgμ استفاده شد. پس از انجام آزمایشات مربوطه اطلاعات بدست آمده جهت تجزیه و تجلیل مورد استفاده قرار گرفتند.

محاسبات آماری

از ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۰ نمونه به دلیل کیفیت نامطلوب نمونه خون حذف شد و نتایج ۹۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. حضور یا عدم حضور جنس آناپلاسما در گسترش خونی و محصول PCR به‌صورت درصد نمونه‌های مثبت و یا منفی از کل نمونه‌های مورد بررسی محاسبه شد. همچنین در مقایسه نتایج آزمون میکروسکوپی با تهیه گسترش‌های خونی

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر نمونه های DNA و یا محصول PCR اولیه.

پرایمر	شماره دسترسی در بانک ژنی	توالی نوکلئوتیدی۱	PCR اندازه محصول
جنس آناپلاسما	AF۴۱۴۳۹۹	F: ۵` AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ۳`	bp ۱۴۶۸
		R: ۵` ACAGCTACCTTGTTACGACTT ۳`	
Nested PCR	AF۴۱۴۳۹۹	F: ۵` GGTACCTATAGAAGAAGTCC ۳`	bp ۳۴۵
		R: ۵` TAGCACTCATCGTTTACAGC ۳`	
آناپلاسما فاگوسیتوفیلم	MV۳۲۲۰	F: ۵` GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC ۳`	bp ۹۲۶
		R: ۵` CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC ۳`	
آناپلاسما بوویس	U۰۳۷۷۵	F: ۵` CTCGTAGCTTGCTATGAGAAC ۳`	bp ۵۵۱
		R: ۵` TCTCCCGGACTCCAGTCTG ۳`	
آناپلاسما سنتراله	AF۲۸۳۰۰۷	F: ۵` CAAATCTGTAGCTTGCTACGGA ۳`	bp ۴۰۳
		R: ۵` GAGTTTGCCGGGACTTCTTCT ۳`	
آناپلاسما مارجیناله	AF۳۹۳۷۴۲	F: ۵` GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC ۳`	bp ۸۶۶
		R: ۵` CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC ۳`	

۱ F و R به ترتیب، پرایمرهای رفت(Forward) و برگشت(Reverse) می باشند.

و آزمون مولکولی با تکثیر قطعات مربوط به گونه‌های آناپلاسما میزان همسویی نتایج دو آزمون بررسی شد. بدین منظور تعداد نمونه‌هایی که از نظر حضور آناپلاسما در هر دو آزمون مثبت بودند (مثبت حقیقی)، در هر دو آزمون منفی بودند (منفی حقیقی)، در آزمون میکروسکوپی مثبت اما در آزمون مولکولی منفی بودند (مثبت کاذب) و یا در آزمون میکروسکوپی منفی اما در آزمون مولکولی مثبت بودند (منفی کاذب) شمارش شدند. حساسیت (Sensitivity)، اختصاصیت (Specificity)

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

$$\text{اختصاصی بودن} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}}$$

$$\text{صحت} = \frac{\text{منفی حقیقی} + \text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی} + \text{مثبت حقیقی}}$$

و صحت (Accuracy) براساس فرمول جیکوبسن (۱۵) به صورت زیر محاسبه گردید.

نتایج و بحث

آزمون میکروسکوپی

رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی با گیمسا و مشاهده اجرام آناپلاسمایی درون گلبول‌های قرمز ۲۶ نمونه (۲۸/۸۹ درصد) حضور جنس آناپلاسما را نشان داد در حالی که ۴ نمونه (۴/۴۴ درصد) مشکوک به درگیری با جنس آناپلاسما بودند. با توجه به اینکه نمونه‌های مشکوک را نمی‌توان نمونه فاقد جنس آناپلاسما دانست، در مقایسه آزمون میکروسکوپی و مولکولی جنس آناپلاسما به‌عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. در بین نمونه‌های مثبت بالا، اجرام آناپلاسمایی درون گلبول‌های قرمز در زیر میکروسکوپ مشاهده شد و آناپلاسما مارجیناله در ۷ نمونه (۷/۷۸ درصد) و آناپلاسما سنتراله در ۱ نمونه (۱/۱۱ درصد) از گسترش‌های خونی مشاهده شد (شکل ۱). شیوع درگیری با آناپلاسما با روش میکروسکوپی مطابق با تحقیق حاضر در برخی مناطق ایران مثبت تشخیص داده شد (۱۱, ۳۱) در حالی که مغایر با تحقیق حاضر در برخی مطالعات این روش قادر به تشخیص شیوع آناپلاسما در شترهای مورد مطالعه نبود (۳۲).

جدول ۴- مقایسه آزمون مولکولی و میکروسکوپی در تشخیص جنس آناپلاسما.

نوع آزمون		مولکولی	
		مثبت	منفی
میکروسکوپی	مثبت	۷	۱۹
	منفی	۲۶	۳۸
حساسیت= ۲۱ درصد، اختصاصیت= ۶۶/۶۷ درصد و صحت= ۵۰ درصد			

جدول ۳- نتایج کلی آزمون مولکولی نمونه های خون شترهای کشتارگاه در استان گلستان.

روش آزمایش	فراوانی نمونه های مثبت (درصد)	فراوانی نمونه های منفی (درصد)	جنس و گونه
اولیه PCR	۳۳ (۳۶/۶۷ درصد)	۵۷ (۶۳/۳۳ درصد)	آناپلاسما
nested-PCR	۲ (۲/۲۲ درصد)	۸۸ (۹۷/۷۸ درصد)	آناپلاسما مارجیناله
nested-PCR	۲۰ (۲۲/۲۲ درصد)	۷۰ (۷۷/۷۸ درصد)	آناپلاسما فاگوسیتوفیلم
nested-PCR	۱۲ (۱۳/۳۳ درصد)	۷۸ (۸۶/۶۷ درصد)	آناپلاسما بوویس
nested-PCR	۰ (۰ درصد)	۹۰ (۱۰۰ درصد)	آناپلاسما سنتراله

تاکنون پژوهش‌های زیادی در خصوص شناسایی گونه‌های آناپلاسما در گاو و گوسفند صورت گرفته است (۲۴, ۲۶-۲۹) در حالی که اطلاعات در مورد شتر بسیار کم است. مطالعات اولیه با تهیه گسترش‌های خونی و بررسی محل استقرار گنجیدگی‌های انگل در گلبول قرمز صورت گرفت (۱۰). این روش بر پایه رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی با گیمسا و مشاهده اجرام آناپلاسمایی درون گلبول‌های قرمز با ساختمانی همگن و گرد به قطر ۰/۳ تا ۱ میکرون و به رنگ آبی ارغوانی است (۱۰, ۱۹). در ایران در ۱۷/۱۴ درصد از گسترش‌های خونی تهیه شده از شترهای استان خراسان رضوی حضور آناپلاسما تأیید شد (۱۲). گونه آناپلاسما مارجیناله در ۴ درصد از گسترش‌های خونی تهیه شده از شترهای کشتارگاه مشهد مشاهده شد (۳۱). در شمال غربی مصر جنس آناپلاسما در ۴۷/۴ درصد از شترهای مورد بررسی با آزمون میکروسکوپی مشاهده گردید (۹). میزان شیوع آناپلاسما در این کشور در طی سال‌های اخیر به ۷۸/ ۱۰ درصد رسید (۳۶). در سومالی در ۵۲/۲ درصد گسترش‌های خونی تهیه شده از شترهای منطقه آناپلاسما حضور داشت (۱۳). این درحالی است که در بیش از نیم قرن گذشته میزان آناپلاسما در آن کشور ۴۰ درصد گزارش شده است (۲۳) و حاکی از کنترل شیوع بیماری در منطقه می‌باشد. آنتی‌بادی آناپلاسما مارجیناله در ۱۰/۷ درصد از شترهای مورد آزمون در نیجریه (۳) و ۱۰/۸۳ درصد از شترهای عراق (۲) یافت شد اما در سودان شواهدی از حضور آناپلاسما در گسترش‌های خونی تهیه شده از شترهای منطقه مشاهده نشد (۴). در مطالعه‌ای دیگر بر روی شترهای نیجریه، هموپارازیت‌ها ۲۱/۵ درصد از نمونه‌ها را شامل شدند که جنس آناپلاسما شایع‌ترین هموپارازیت مشاهده شده در داده‌ها بود (۳۰). در هند شترهای درگیر با آناپلاسما کاهش اشتها و زردی مخاط را نشان دادند (۳۵). درگیری با آناپلاسما درجات مختلفی از کم خونی را نیز نشان داده است (۱۳, ۳۰). خون آلوده به آناپلاسما می‌تواند بیماری را از شتر به گاو منتقل کند (۳۵). کنه‌ها شایع‌ترین عامل انتقال بیماری هستند (۲۶).

آزمون مولکولی

استخراج DNA با روش مورد استفاده منجر به حصول مقادیر بالایی از DNA ژنومی شد. OD نمونه DNA استخراجی در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و بین ۱/۹-۱/۷ محاسبه گردید. جفت پرایمر اولیه باند ۱۴۶۸ جفت بازی از ژن 16S rRNA را تکثیر کرد و بنابراین حضور جنس آناپلاسما بدون در نظرگرفتن گونه خاص به‌درستی تشخیص داده شد (شکل ۱). پرایمرهای داخلی تکثیر DNA هدف در محصول PCR اولیه را به‌خوبی تأیید کردند و بنابراین از عدم تکثیر DNA ارگانیسم‌های دیگر، اطمینان حاصل شد. قطعات تکثیری حاصل از PCR اولیه و nested-PCR حضور جنس آناپلاسما در ۳۳ مورد از ۹۰ نمونه مورد بررسی را مثبت نشان داد. نمونه‌های مثبت در قطعات تکثیری حاصل از nested-PCR برای تشخیص گونه‌های آناپلاسما به‌خوبی استفاده شد (شکل ۱).

در میان نمونه‌های مثبت حاصل از nested-PCR، ۲ نمونه نسبت به nested-PCR اختصاصی گونه آناپلاسما مارجیناله مثبت بود. PCR اختصاصی برای تشخیص گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلم، ۲۰ نمونه مثبت نشان داد. ۱۲ نمونه نسبت به PCR اختصاصی گونه آناپلاسما بوویس مثبت بودند درحالی‌که هیچ کدام از نمونه‌ها با PCR اختصاصی، حضور گونه آناپلاسما سنتراله را نشان ندادند (جدول ۳).

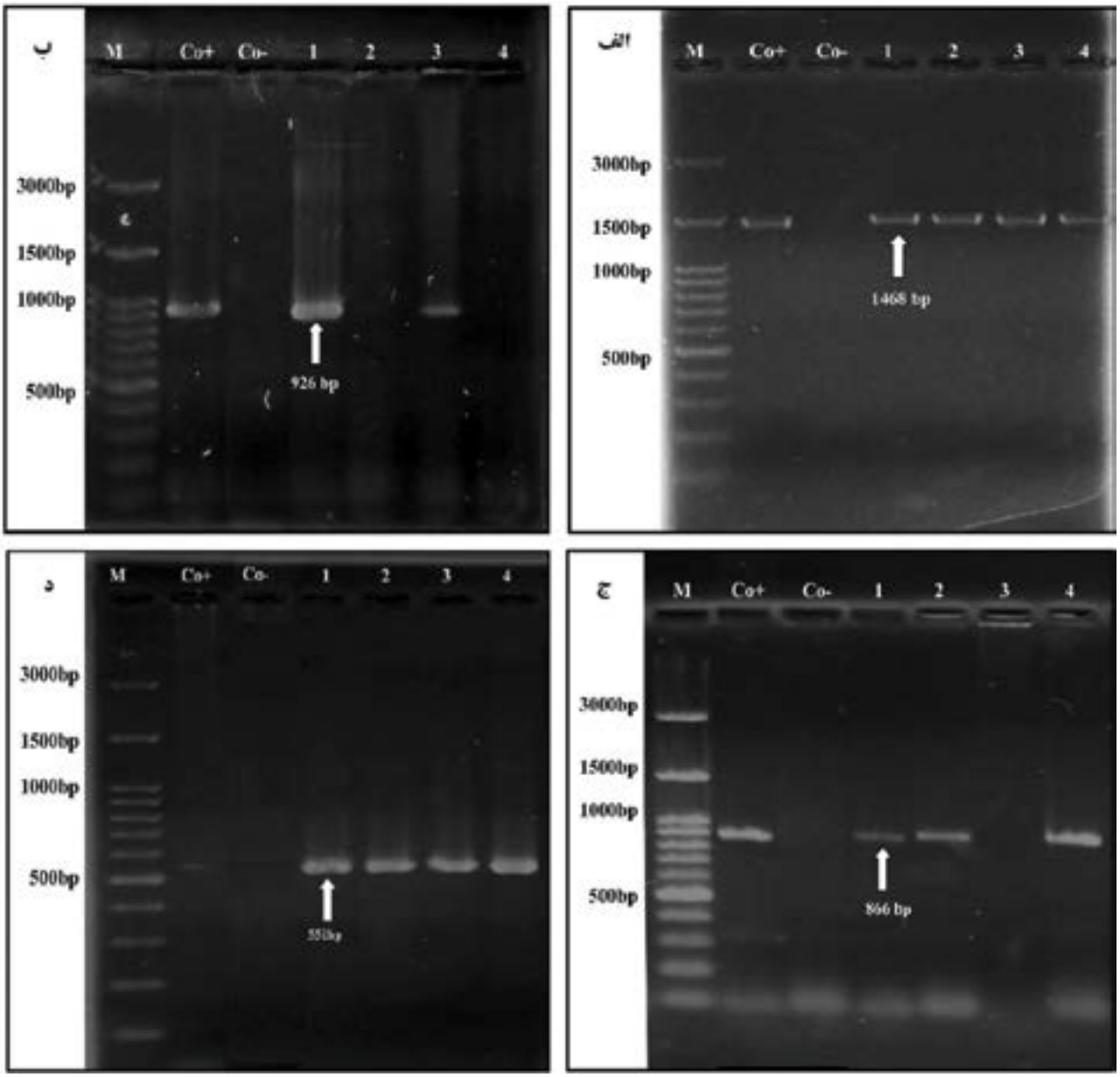
در مطالعه حاضر از پرایمرهای اختصاصی گاو برای تشخیص گونه‌های مختلف آناپلاسما در شتر استفاده شد. روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک گونه‌های آناپلاسما مارجیناله، آناپلاسما سنتراله، آناپلاسما بوویس و آناپلاسما فاگوسیتوفیلم اولین بار در ایران در گاو انجام شد (۲۶). تاکنون تنها گونه‌های آناپلاسما که با توالی‌یابی در شتر تأیید شده‌اند، شامل گونه‌های آناپلاسما پلاتیس، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم و آناپلاسما اوویس می‌باشند (۱, ۵, ۱۸, ۲۵, ۳۴). در رده‌بندی جنس آناپلاسما نشان داده شده است که ژن 16S rRNA توانایی زیادی در تفریق برخی گونه‌های این جنس دارد (۱۹). در مطالعه‌ای بر روی ۱۰۰ نمونه خون شتر در جنوب ایران، با تکثیر ملکولی ژن *16S* rDNA، حضور آناپلاسما (Anaplasma Camelii) در ۶ نمونه (۶ درصد) گزارش شد. آنالیز ژنتیکی ژن 16S rDNA سویه ایران تطابق ۱۰۰ درصدی با آناپلاسمای بدست آمده در عربستان سعودی و تونس در بانک ژنی داشت (۳۴). نعمان (۲۵) با مطالعه بر روی نمونه خون‌های شترهای استان گلستان با تکثیر قطعه ۷۵۰ جفت بازی از ژن *16S* rRNA شباهت ۹۹/۶-۱۰۰ درصدی با توالی‌های قبلی این ژن در بانک ژنی مشاهده نمود. بر طبق آنالیز پلی ژنی ۲ توالی از یک خوشه شامل آناپلاسما اوویس بدست آمده است (۲۵). ژن groEL (۱۸)، hsp60، MSP4 و rpoB از دیگر ژن‌های مورد بررسی برای تکثیر قطعات و شناسایی گونه‌های آناپلاسما مورد استفاده قرار گرفته است (۱). روش‌های مولکولی امروزه ابزاری مناسب جهت شناسایی گونه‌های مختلف آناپلاسما در حیوانات مختلف از جمله گاو، گوسفند، اسب و شتر هستند(۲۵-۲۹, ۳۶). در مصر نرخ حضور آناپلاسما با روش مولکولی ۶۷/۳۷ درصد بود (۹). بر طبق ناگا و برقش (۹) تنها گونه آناپلاسما مارجیناله در ۲۲/۹ درصد نمونه‌های PCR دیده شد درحالی‌که گونه فوق به همراه گونه آناپلاسما سنتراله ۷۷/۱ درصد شیوع بیماری در نمونه‌ها را نشان داد. در سومالی آناپلاسما در ۵۴/۹ درصد محصولات PCR شترهای منطقه حضور داشت (۱۳). در جنوب مراکش ۳۹/۶۲ درصد از نمونه‌های مورد بررسی از نظر آناپلاسما مثبت بودند (۱۸). تفاوت نتایج مطالعات در نواحی مختلف ایران و جهان ممکن است به اختلاف در شرایط آب و هوایی، مدیریت مزرعه، اقدامات بهداشتی، گسترش جغرافیایی کنه‌ها و برنامه‌های کنترل کنه در هر منطقه مربوط باشد. با توجه به تأثیر کنه در انتقال بیماری اقدامات بهداشتی جهت کنترل آن‌ها یکی از راه کارهای مهم در مبارزه با شیوع بیماری آناپلاسموزیس می‌باشد.

مقایسه آزمون میکروسکوپی و آزمون مولکولی

مقایسه آزمون مولکولی و میکروسکوپی در تشخیص جنس آناپلاسما و گونه‌های آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما سنتراله در جدول ۴ ارائه شده است.

در مطالعه حاضر فراوانی شناسایی جنس آناپلاسما با آزمون مولکولی

(۳۶/۶۷ درصد) بیشتر از آزمون میکروسکوپی (۳۳/۳۳ درصد) بود. البته نمونه‌های مثبتی از آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما سنتراله با آزمون میکروسکوپی (به‌ترتیب ۷/۷۸ و ۱/۱۱ درصد) شناسایی شدند که با آزمون مولکولی (به‌ترتیب ۲/۲۲ و صفر درصد) نمونه‌های منفی تشخیص داده شدند. در جنوب شرقی ایران نیز با مطالعه بر روی ۲۰۰ نمونه خون شتر شواهدی از تشخیص میکروسکوپی آناپلاسما دیده نشد در حالی که ۱۵٪ نمونه‌ها در آزمایش مولکولی درگیر با آناپلاسما یافت شدند (۳۲). در مطالعه حاضر میزان حساسیت، اختصاصیت و صحت برای شناسایی



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR اولیه با استفاده از پرایمرهای اولیه (الف) و محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آناپلاسما فاگوسیتوفیلم (ب)، آناپلاسما مارجیناله (ج) و آناپلاسما بوویس (د) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. +Co: کنترل مثبت‌آناپلاسما Co-: کنترل منفی‌آناپلاسما. M۱۰۰: نشانگر اندازه bp ۱۰۰.

جنس آناپلاسما به‌ترتیب ۲۱، ۶۶/۶۷ و ۵۰ درصد محاسبه شد. حساسیت، احتمال این است که دام درگیر با آناپلاسما با آزمون میکروسکوپی مثبت شناسایی شوند. اختصاصیت، احتمال اینکه شترهای درگیر نشده با بیماری، با آزمایش میکروسکوپی نیز منفی مشخص شوند را نشان می‌دهد و صحت میزان نزدیکی نتایج آزمون میکروسکوپی به آزمون مولکولی است. مقایسه نتایج حاصل از آزمون میکروسکوپی و مولکولی بر روی نمونه‌های خون شترهای کشور سومالی، تکنیک PCR را حساس‌تر و دقیق‌تر از روش تهیه گسترش خونی نشان داد (۱۳). در مطالعه‌ای بروی ۲۵۶ نمونه تصادفی از شتر در مصر، حضور آناپلاسما در ۳۸/۳ درصد و ۹۰/۶۳ درصد از نمونه‌ها به‌ترتیب با آزمون-های میکروسکوپی و مولکولی شناسایی شد و ۹/۳۸ درصد از نمونه‌ها با هر دو آزمون منفی تشخیص داده شدند. تعداد نمونه‌های مثبت کاذب صفر بود در حالی که ۵ نمونه منفی کاذب وجود داشت. به‌عبارت دیگر، در مطالعه فوق نمونه‌ای وجود نداشت که با آزمون میکروسکوپی شناسایی شود اما با آزمون مولکولی تشخیص داده نشود. تعدادی از نمونه‌های شناسایی شده با آزمون مولکولی (۱/۹۵ درصد) با آزمون میکروسکوپی تشخیص داده نشدند (۹). وابا و همکاران (۳۶) نیز در مقایسه آزمون سرولوژی با کیت الیزا و آزمون میکروسکوپی با تهیه گسترش خونی در نمونه‌های گاو دریافتند که کیت الیزا (۲۷/۶۶ درصد) نسبت به گسترش‌های خونی (۱۴/۸۹ درصد) قادر به شناسایی نمونه‌های بیشتری از دام درگیر با آناپلاسما مارجیناله بود. وابا و همکاران (۳۶) میزان حساسیت، اختصاصیت و صحت را به‌ترتیب ۱۰۰، ۸۹/۴۷ و ۹۱/۱۱ درصد بدست آوردند.

تفاوت نتایج حاصل از تشخیص مولکولی و میکروسکوپی آناپلاسما در نمونه‌های مورد آزمایش ممکن است ناشی از اشتباهات آزمایشگاهی در مشاهدات زیر میکروسکوپی (شناسایی اجسام هاول ژولی و یا اجسام هینز به‌جای آناپلاسما) و یا بررسی محصولات PCR باشد. در روش تشخیص میکروسکوپی باید اجرام آناپلاسمایی از رسوب ذرات رنگ، اجسام معروف به هاول ژولی بادی(Howell-Jolly body) که در حقیقت اسید نوکلئیک گلبول‌های قرمز نارس می‌باشند و شباهت زیادی به آناپلاسما دارند و اجسام هینز (Heinz bodies) تفریق شوند (۱۰). تحقیقات نشان داده است تعداد گلبول‌های قرمز آلوده به میکروارگانیسم در دام ناقل بیماری، پایین (۱۰۲ تا ۱۰۷ در میلی‌لیتر خون) است. در واقع تعداد گلبول‌های قرمز آلوده به میکروارگانیسم در حدی نیست که به روش میکروسکوپی قابل تشخیص باشد (۱۰,۱۴). استفاده از تکنیک PCR در روش مولکولی توانایی تشخیص کمتر از ۱۰-۵۰ گلبول قرمز یا سفید آلوده به آناپلاسما در هر میلی لیتر خون را دارد (۲۲). بنابراین، آزمایش میکروسکوپی گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا جهت تشخیص دام ناقل بیماری به نظر کاربردی نمی‌باشد (۱۴). زیرا علاوه براینکه این روش در بسیاری موارد قادر به تشخیص افراد ناقل نمی‌باشد در صورت تشخیص قادر به تمایز اجرام آناپلاسمایی از ذرات رنگ، اجسام هاول ژولی و اجسام هینز نیست. امروزه روش مولکولی به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص گونه‌های آناپلاسما به شمار می‌آید (۷).

نتیجه‌گیری

بررسی میکروسکوپی و مولکولی جنس و گونه‌های آناپلاسما در نمونه خون‌های جمع‌آوری شده از شترهای کشتار شده در استان گلستان برای اولین بار در مطالعه حاضر صورت گرفته است. براساس نتایج بیش از یک سوم نمونه‌های مورد بررسی آلوده به جنس آناپلاسما بوده‌اند. با بررسی اجرام آناپلاسمایی درون گلبول‌های قرمز خون در زیر میکروسکوپ، گونه‌های آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما اوویس تشخیص داده شد. با تکثیر موکولی قطعات DNA مختص گونه‌های مختلف آناپلاسما، گونه‌های آناپلاسما فاگوسیتوفیلم، آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما بوویس شناسایی شد. بررسی مولکولی نمونه‌ها شناسایی گونه‌های آناپلاسما را با صحت بیشتری نسبت به آزمون میکروسکوپی انجام داد. با توجه به اینکه شترها می‌توانند بیماری‌های مشترک را به دیگر حیوانات منتقل کنند، بررسی انگل‌های خونی در شترهای مناطق مختلف ایران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر طبق نتایج مطالعه حاضر درگیری شترهای استان گلستان با آناپلاسما تأیید شده است و مراقبت‌های بهداشتی و کنترل آلودگی‌های انگلی از طریق مبارزه با بند پایان و تهیه واکسن‌های ضد کنه می‌تواند حائز اهمیت باشد.

منابع مورد استفاده

1- Abdel-Shafy, S., N. A. T. Allam and M. S. Mahmoud. 2016. Molecular Description of Anaplasma Biodiversity regarding 16SrDNA, msp4, hsp60, and rpoB Profiles in Ixodid Ticks Infesting Animals from Some Egyptian Provinces. *Bull NRC* 41: 121-136.

2- AJ. Al-Gharban, H. and H. SR. AL-Taee. 2016. Seroclinical Diagnosis of Anaplasma Marginale Bacteria in Carrier Arabian One-Humped Camels. *Basrah Journal of Veterinary Research* 15: 346-359.

3- Alsaad, K. M. 2009. Clinical, hematological and biochemical studies of anaplasmosis in Arabian one-humped camels (Camelus dromedarius). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8: 2106-2109.

4- Bala, A. E., A. D. Abakar, M. S. Mohammed and M. A. Abbas. 2018. Prevalence of Trypanosoma evansi in camels in four states of Great Butana, Sudan. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6: 1207-1211.

5- Bastos, A. D. S., O. B. Mohammed, N. C. Bennett, C. Petevinos and A. N. Alagaili. 2015. Molecular detection of novel Anaplasmataceae closely related to Anaplasma platys and Ehrlichia canis in the dromedary camel (Camelus dromedarius). *Veterinary Microbiology* 179: 310-314.

6- Carelli, G., N. Decaro, A. Lorusso, G. Elia, E. Lorusso, V. Mari, L. Ceci and C. Buonavoglia. 2007. Detection and quantification of Anaplasma marginale DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 124: 107-114.

7- de Echaide, S. T., M. F. Bono, C. Lugaresi, N. Aguirre, A. Mangold, R. Moretta, M. Farber and C. Mondillo. 2005. Detection of antibodies against Anaplasma marginale in milk using a recombi-

anaplasma camelii" in one-humped camels (Camelus dromedarius) in Morocco: a novel and emerging anaplasma species? *Infect Dis Poverty* 6: 1.

19- Liu, Z., J. Luo, Q. Bai, M. Ma, G. Guan and H. Yin. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of Anaplasma species in China for phylogenetic analysis. Veterinary Microbiology 107: 145-148.

20- Martin, S. W., A. H. Meek and P. Willeberg. 1987. Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames IA.

21- McQuiston, J. H., C. L. McCall and W. L. Nicholson. 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223: 1750-1756.

22- Molad, T., M. L. Mazuz, L. Fleiderovitz, L. Fish, I. Savitsky, Y. Krigel, B. Leibovitz, J. Molloy, F. Jongejan and V. Shkap. 2006. Molecular and serological detection of A. centrale- and A. marginale-infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology* 113: 55-62.

23- Monteverde, G. 1937. Anaplasmosi nei cammelli in Cirenaica. *Clinic Veterinary* (Milano) 60: 73-77.

24- Noaman, V. 2016. A review of anaplasmosis and the prevalence of Anaplasma marginale in cattle in Iran and the world. *Veterinary Researches and Biological Products* 30: 2-15.

25- Noaman, V. 2018. Molecular Detection of Novel Genetic Variants Associated to Anaplasma ovis among Dromedary Camels in Iran. *Arch Razi Inst* 73: 11-18.

26- Noaman, V. 2019. A review on Anaplasma phagocytophilum as a zoonotic agent: review article (In Farsi). *Tehran University Medical Journal* 76: 778-785.

27- Noaman, V. and P. Shayan. 2019. Molecular Detection of Anaplasma Phagocytophilum in Carrier Cattle of Iran - First Documented Report. *Iranian Journal of Microbiology* 1: 37-42.

28- Noaman, V., P. Shayan and A. H. Shahmoradi. 2009. Detection of Anaplasma ovis based on 16S rRNA gene by PCR-RFLP in sheep from central part of Iran (In Farsi). *Journal of Veterinary Laboratory Research* 1: 25-35.

29- Poorghafoor-Langroodi, P., V. Noaman, S. Esmaeilkhanian, A. H. Shahmoradi, M. R. Heidari, A. R. Hatami, A. Rahimi and A. A. Fouisi-Yousofi. 2015. Molecular detection of Anaplasma species in cattle and sheep of Golestan (In Farsi). Final Report of Research Project Department of Education and Research. Golestan Research Center and Education of Agriculture and Natural Resources.

30- Rabana, J. L., H. A. Kumshe, J. Kamani, G. Hafsat, U. A. Turaki and H. K. Dilli. 2011. Effects of Parasitic Infections on Erythrocyte Indices of Camels in Nigeria. *Veterinary Research Forum* 2: 59-63.

31- Ranjbar Bahadori, S., M. Aghaei Ghamsari and A. Safdari. nant MSP5 indirect ELISA. *Veterinary Microbiology* 106: 287-292.

8- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145-2165.

9- El-Naga, T. R. A. and S. Barghash. 2016. Blood Parasites in Camels (Camelus dromedarius) in Northern West Coast of Egypt. *Journal of Bacteriology and Parasitology* 7.

10- Ge, N. L., K. M. Kocan, G. L. Murphy and E. F. Blouin. 1995. Detection of Anaplasma marginale DNA in bovine erythrocytes by slot-blot and in situ hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-labeled DNA probe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 465-472.

11- Ghashghaei, O., S. R. Nourollahi Fard, M. Khalili and H. Sharifi. 2016. Abundance and associated risk factors of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from one-humped camels (Camelus dromedarius) in Sistan and Balouchestan region, southeast of Iran. *Persian Journal of Acarology* 5.

12- Ghazvinian, K. and T. Khodaiean. 2016. Anaplasmosis among Camels in Iran and Observation of Abnormalities in Infected Blood Films. *International Journal of Animal and Veterinary Sciences* 10: 475-478.

13- Ibrahim, A. M., A. A. H. Kadle and H. S. Nyingilili. 2017. Microscopic and Molecular Detection of Camel Piroplasmosis in Gadarif State, Sudan. *Veterinary Medicine International* 2017: 5.

14- Ismael, A. and A. A. A. Swelum. 2016. First evidence of natural anaplasmosis in Camelus dromedarius in Saudi Arabia. *Journal of Camel Practice and Research* 23: 1-6.

15- Jacobson, R. H. 1996. rinciples of validation of diagnostic assays for infectious disease. In manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. Paris.

16- Kocan, K. M., J. de la Fuente, E. F. Blouin and J. C. Garcia-Garcia. 2004. Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129 Suppl: S285-300.

17- Kocan, K. M., J. de la Fuente and A. Cabezas-Cruz. 2015. The genus Anaplasma: new challenges after reclassification. *Revue Scientifique et Technique* 34: 577-586.

18- Lbacha, A. H., Z. Zouagui, S. Alali, A. Rhalem, E. Petit, M. J. Ducrotoy, H. J. Boulouis and R. Maillard. 2017. "Candidatus

2015. Investigation of blood parasites of slaughtered camels in Mashhad abattoir (In Farsi). 15th Iranian Veterinary Congress. Tehran.

32- Sazmand, A., J. Harl, B. Eigner, A. Hodzic, R. Beck, S. Hekmatimoghaddam, M. Mirzaei, H. P. Fuehrer and A. Joachim. 2019. Vector-borne bacteria in blood of camels in Iran: New data and literature review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 65: 48-53.

33- Setayeshgar, F. 2019. Opportunities for camel breeding in Golestan (In Farsi). Hamshahri Online.

34- Sharifiyazdi, H., S. Jafari, M. Ghane, S. Nazifi and A. Sanati. 2017. Molecular investigation of Anaplasma and Ehrlichia natural infections in the dromedary camel (Camelus dromedarius) in Iran. *Comparative Clinical Pathology* 26: 99-103.

35- Sudan, V., R. L. Sharma and M. K. Borah. 2014. Subclinical anaplasmosis in camel (Camelus dromedarius) and its successful therapeutic management. *Journal of Parasitic Diseases* 38: 163-165.

36- Wahba, A. A., S. G. Ghattas, R. S. Fadly and K. A. M. Shokier. 2017. Serological and microscopical diagnosis of anaplasmosis in some farm animals. *Animal Health Research Journal* 5: 68-75.