

بررسی مولکولی و هماتولوژیک آلودگی به *آنپلاسما مارژیناله* در گاو میش های رودخانه ای کشتار شده در اهوازعلی عباس نیکوند<sup>۱</sup>، احسان حسن پور بساطی<sup>۲</sup>، داریوش غریبی<sup>۳</sup>، سیده میثاق جلالی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران<sup>۲</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران<sup>۳</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایرانdoi [10.22059/jvr.2019.263796.2837](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.263796.2837)

تاریخ دریافت: ۲۰ آذر ماه ۱۳۹۸، تاریخ پذیرش: ۲۱ بهمن ماه ۱۳۹۸

## چکیده

**زمینه مطالعه:** اطلاعات اندکی در زمینه عفونت به *آنپلاسما مارژیناله* در گاو میش رودخانه ای موجود است و تا کنون گزارشی از آنپلاسموز بالینی گاو میش در ایران یافت نشده است.

**هدف:** بررسی مولکولی و هماتولوژیک آلودگی به *آنپلاسما مارژیناله* در گاو میش های به ظاهر سالم ارجاعی به کشتارگاه اهواز. **روش کار:** از ۱۰۳ رأس گاو میش به ظاهر سالم ارجاعی به کشتارگاه نمونه های خون و بافت طحال اخذ گردید. نمونه های خون با روش های گسترش میکروسکوپی و PCR و نمونه های طحال فقط با آزمایش PCR بررسی شدند. در این مطالعه یک روش nested-PCR با تکثیر قطعه ای از ژن groEL باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

**نتایج:** میزان آلودگی نمونه های خون و طحال به روش PCR به ترتیب ۳۱/۱ و ۱/۹ درصد بود. گاو میش هایی که در آزمایش PCR طحال مثبت بودند، در PCR خون نیز مثبت شدند. اجرام آنپلاسمایی در گسترش خونی ۱۵/۵ درصد نمونه ها مشاهده شد. ضریب توافق کاپای ضعیفی بین نتایج گسترش میکروسکوپی و PCR خون یافت شد. تفاوت معنی داری از نظر میانگین شاخص های هماتولوژیک بین دام های آلوده و غیر آلوده در روش PCR یافت نشد.

**نتیجه گیری نهایی:** میزان قابل توجه آلودگی به *آنپلاسما مارژیناله* در گاو میش های تحت مطالعه، می تواند نقش احتمالی گاو میش به عنوان مخزن عامل بیماری و انتقال آن را به گاو مطرح کند.

**کلمات کلیدی:** *آنپلاسما مارژیناله*، طحال، گاو میش رودخانه ای، groEL، PCR

کپی رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد، کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: علی عباس نیکوند، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

پست الکترونیکی: [a.nikvand@scu.ac.ir](mailto:a.nikvand@scu.ac.ir)

## مقدمه

*آنپلاسما مارژیناله* می شوند (۱۶). آنپلاسموزیس می تواند با زبان اقتصادی چشمگیری همراه باشد، طوری که تخمین زده می شود که خسارات سالیانه اقتصادی ناشی از *آنپلاسما مارژیناله* در ایالات متحده به حدود ۳۰۰ میلیون دلار می رسد (۱۸). مطالعات سرولوژیک نشان داده اند که گاو میش آمریکایی مخزن *آنپلاسما مارژیناله* می باشد و حیوانات مخزن می توانند منبعی ماندگار از خون آلوده جهت انتشار مکانیکی از طرق مختلف و نیز انتقال بیولوژیک توسط کنه ها باشند (۵). مشخصه بارز آنپلاسموز بالینی،

آنپلاسما یک باکتری داخل سلولی اجباری هست که ایتروسیت های مهره داران عالی به ویژه نشخوارکنندگان را آلوده می کند (۴، ۱۲). از جنس آنپلاسما، *آنپلاسما مارژیناله* در گاو و نشخوارکنندگان وحشی و *آنپلاسما اویس* در گوسفند و بز عامل بیماری است. *آنپلاسما سنتراله* نیز که ارتباط نزدیکی با *آنپلاسما مارژیناله* دارد، عامل آنپلاسموز خفیف در گاو در آفریقا شناخته شده است (۱، ۴). نه تنها گاو، بلکه دیگر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی مانند گاو میش رودخانه ای دچار عفونت دائمی و ناقل برای

رودخانه‌ای در مقایسه با گاو (۹) به ثبت نرسیده است، نظر به توضیحات ذکر شده این فرضیه از طرف نویسندگان مطرح است که ممکن است در گاو میش، طحال با فاگوسیتوز سریع گلبول‌های قرمز آلوده به *آنپلاسما مارژیناله*، فرصت تکثیر بیشتر و ایجاد بیماری بالینی به باکتری را ندهد. با پذیرش این فرضیه انتظار می‌رود میزان آلودگی در طحال بیشتر از خون باشد. با توجه به موارد فوق، مطالعه حاضر با هدف بررسی مولکولی آلودگی به *آنپلاسما مارژیناله* به روش PCR و برخی شاخص‌های هماتولوژیک آلودگی به این باکتری روی گاو میش‌های ارجاعی به کشتارگاه اهواز انجام گرفت.

### مواد و روش کار

در فاصله زمانی شهریور تا آذر ۱۳۹۶ با مراجعه به کشتارگاه دام اهواز، از تعداد ۱۰۳ رأس گاو میش به‌ظاهر سالم (۳۶ رأس ماده و ۶۷ رأس نر با محدوده سنی ۱ تا ۱۰ سال) به‌صورت تصادفی پس از کشتار نمونه‌گیری به‌عمل آمد. دام‌های تحت بررسی نیز بر اساس وضعیت شیری و دائمی بودن دندان‌های ثنایا به دو دسته زیر ۲/۵ سال (شیری، نابالغ، ۲۹ رأس) و بالای ۲/۵ سال (بالغ، ۷۴ رأس) تقسیم شدند. بلافاصله پس از کشتار، از هر رأس دام یک نمونه خون اخذ شده و در دو لوله واجد ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید. یکی از نمونه‌های خون برای تهیه گسترش خونی و بررسی شاخص‌های هماتولوژی در همان روز نمونه‌گیری استفاده شد و دیگری جهت استخراج DNA تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پس از کشتار و باز شدن حفره بطنی طحال از حفره شکمی جدا و با استفاده از یک کارد پلاستیکی یک‌بار مصرف، پس از برش در سطح طحال مقداری از بافت طحال تقریباً ۱ سانتی‌متر برداشت و به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری استریل منتقل گردید. نمونه‌های طحال نیز تا زمان انجام استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### تهیه گسترش میکروسکوپی و ارزیابی شاخص‌های

**هماتولوژی:** گسترش‌های خونی پس از رنگ آمیزی با گیمسا از نظر وجود اجرام آنپلاسمایی، با بزرگنمایی ۱۰۰۰، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. در هر گسترش خونی حداقل ۲۰ میدان میکروسکوپی به‌طور دقیق مورد مشاهده قرار گرفت. مقادیر شاخص‌های هماتولوژی شامل تعداد تام گلبول‌های سفید (WBC)، گلبول‌های قرمز (RBC)، حجم فشرده سلولی (PCV)

آمی ناشی از فاگوسیتوز اریتروسیت‌های آلوده است. شدت علائم بالینی با درجه آمی مرتبط است و شامل بی‌رنگی پوست و غشاهای مخاطی و افزایش ضربان قلب و تنفس می‌باشد (۴، ۱۲).

تشخیص آنپلاسموز گاوی ممکن است به‌طور تجربی و بر اساس منطقه جغرافیایی، فصل و علائم بالینی و یا یافته‌های کالبدگشایی در حیوانات مبتلا صورت گیرد. جهت تأیید تشخیص آزمون‌های آزمایشگاهی مانند بررسی گسترش خون، روش‌های تشخیصی سرولوژیک یا مولکولی مورد نیاز است. از روش PCR با استفاده از پرایم‌هایی از ژن اپران groEL برای تشخیص گونه‌های آنپلاسما استفاده شده است (۲۲). ژن groEL، که کد کننده پروتئین‌های خانواده chaperonin است، در باکتری‌های متعددی یافت می‌شود (۲۷). مزیت آن این است که تغییرات بیشتری بین گونه‌ها نسبت به ژن 16S rRNA دارد (۸، ۲۵)، در حالی که ژن 16S rRNA دارای هم‌خوانی بسیار نزدیک بین گونه‌های نزدیک است (۲۶).

گاو میش در ایران در سه اقلیم متفاوت، مرتفع سردسیر، معتدل و مرطوب مدیترانه‌ای و پست جلگه‌ای گرم (شامل استان خوزستان و قسمتی از لرستان) نگهداری می‌شود (۷). بنابر گزارش مرکز آمار ایران در سال ۱۳۹۰، جمعیت کل گاو میش‌های ایران، حدود ۱۶۰ هزار رأس بوده و تقریباً ۱۰۰ هزار رأس آن در استان خوزستان پرورش داده می‌شوند. تولید شیر در گاو میش‌های مناطق مختلف ایران با همدیگر متفاوت است به‌طوری‌که تعداد روزهای شیردهی و مقدار شیر (کیلوگرم در سال) در گاو میش‌های خوزستان به ترتیب ۲۴۰ روز و ۱۹۰۰ کیلوگرم تعیین گردیده است (۲).

مطالعات اندکی در خصوص آلودگی به *آنپلاسما مارژیناله* در گاو میش رودخانه‌ای در ایران در دسترس است. نتایج یک مطالعه در برزیل نیز نشان داده است که گاو میش آلوده به *آنپلاسما مارژیناله* می‌تواند مخزن بیماری برای گاو باشد (۲۱). به طور طبیعی در طی آلوده شدن بیماران به *آنپلاسما مارژیناله*، باکتری در درون اریتروسیت‌های آلوده اولیه پس از تکثیر و اگزوسیتوز به اریتروسیت‌های دیگر منتقل می‌شود. اریتروسیت‌های آلوده به واسطه فاگوسیتوز توسط سیستم رتیکولوئندوتلیال خصوصاً طحال از گردش خون حذف می‌شوند (۴). همچنین، تاکنون مطالعه مولکولی که حضور *آنپلاسما مارژیناله* در طحال گاو میش را بررسی کرده باشد، یافت نشده است. اینکه گزارشی از بیماری بالینی آنپلاسموزیس در گاو میش

بود. چرخه‌های دمایی مرحله دوم PCR مشابه با مرحله اول بود با این تفاوت که فقط دمای اتصال پرایمرها برای سیکل سوم ۶۸ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. سپس ۷ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نمونه کنترل مثبت PCR از خون یک رأس گاو مبتلا به فرم بالینی آناپلازما مارژیناله که واجد پارازایتمی شدید و مشخص در گسترش میکروسکوپی بود، استفاده شد. باند DNA با استفاده از اشعه UV توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

**تعیین توالی محصول PCR:** برای تأیید موارد مثبت آناپلازما مارژیناله در واکنش PCR، تعداد ۲ نمونه از موارد مثبت محصولات PCR (یک نمونه مربوط به خون و یک نمونه طحال) برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی مربوطه توسط نرم افزار Bio Edit مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژنی (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) در **NCBI** مورد مقایسه قرار گرفت.

**تحلیل‌های آماری:** نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام گرفت. به منظور بررسی رابطه سن و جنس با میزان آلودگی و رابطه میزان آلودگی در PCR خون با میزان آلودگی در PCR طحال و گسترش میکروسکوپی از آزمون مربع کای (Chi-square test) استفاده شد. مقایسه میانگین مقادیر شاخص‌های هماتولوژیک در دام‌های آلوده و غیر آلوده با آزمون t مستقل (Independent sample t test) و نیز تعیین میزان توافق بین نتایج PCR خون با PCR طحال و گسترش میکروسکوپی از ضریب توافق کاپا (Kappa agreement) با درجه اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

و غلظت هموگلوبین (Hb) دام‌های مورد مطالعه توسط دستگاه Auto Hematology Analyser (BC-2800 Vet, China, Mindray) تعیین گردید.

**استخراج DNA و آزمایش PCR:** استخراج DNA نمونه‌های خون با استفاده از کیت (شرکت رها زیست پادتن، ایران) که برای تخلیص DNA ژنومی خون کامل به کار می‌رود، طبق دستورالعمل انجام گرفت. استخراج DNA نمونه‌های طحال با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA از بافت Sina pure (سیناژن، ایران، PR8816113/EX6011) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. نمونه‌های DNA تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی آناپلازما مارژیناله در نمونه‌های DNA استخراج شده از خون و طحال با استفاده از تکثیر قطعه‌ای از ژن groEL این باکتری و به روش Nested-PCR انجام گرفت (۲۵). توالی پرایمرهای مورد استفاده مرحله اول و دوم PCR در جدول ۱ آمده است.

واکنش PCR در دو مرحله انجام شد. مرحله اول در حجم ۱۵ میکرولیتر و PCR مرحله دوم در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقادیر و اجزای واکنش PCR مرحله اول شامل: ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر پرایمر F1، ۱ میکرولیتر پرایمر R1، ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده بود. مقادیر مذکور در داخل یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط و به دستگاه ترموسایکلر گرادینت (Eppendorf، آلمان) منتقل گردید.

واکنش PCR مرحله دوم در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که اجزای واکنش حاوی: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر F2، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر R2، ۹ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر محصول PCR مرحله اول

**جدول ۱.** توالی پرایمرهای ژن groEL استفاده شده برای شناسایی آناپلازما مارژیناله در گاو میش‌های تحت مطالعه.

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
AM265F1 (مرحله اول)	5'-GACTACCACATGCTCCATACTGACTG-3'
AMA424F2 (مرحله دوم)	5'-GTCTGAAGATGAGATTGCACAGGTTG-3'
AM1574R1 (مرحله اول)	5'-GACGTCCACAACACTACTGCATTCAAG-3'
AM1289R2 (مرحله دوم)	5'-CCTTTGATGCCGTCCAGAGATGCA-3'

\* پرایمرهای F1 و R1 در مرحله اول و F2 و R2 در مرحله دوم PCR استفاده شدند.

جدول ۲. مقایسه مقادیر (میانگین و انحراف معیار) برخی شاخص‌های خونی گاو میش‌های تحت مطالعه بر اساس نتایج PCR خون و گسترش میکروسکوپی.

WBC ( $\times 10^3$ /میکرولیتر)	RBC ( $\times 10^6$ /میکرولیتر)	Hg (گرم/دسی‌لیتر)	PCV (درصد)	شاخص خونی روش تشخیص
$9/2 \pm 3/6$	$6/96 \pm 1/1$	$10 \pm 1/5$	$37/5 \pm 7/5$	PCR خون مثبت
$8/5 \pm 3/8$	$7/2 \pm 1/3$	$10/3 \pm 1/9$	$38/9 \pm 7/3$	PCR خون منفی
$P > 0.05$				$P$ Value
$7/5 \pm 2/5$	$7/1 \pm 1$	$10/1 \pm 1/5$	$38/1 \pm 6$	گسترش میکروسکوپی مثبت
$9/1 \pm 3/9$	$7/1 \pm 1/4$	$10/1 \pm 1/9$	$37/4 \pm 6/7$	گسترش میکروسکوپی منفی
$P > 0.05$				$P$ Value

آزمایش گسترش میکروسکوپی نیز واجد اجرام شبه آناپلاسمایی بودند. همچنین از بین ۷۱ رأس گاو میشی که نتایج PCR خون آن‌ها منفی بود، ۷ رأس در آزمایش گسترش میکروسکوپی مثبت تشخیص داده شدند. آزمون مربع کای نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین نتایج PCR خون و گسترش میکروسکوپی وجود دارد ( $P=0/03$ ). همچنین آزمون توافق کاپا نیز توافق ضعیفی ( $Kappa=0/22$ ) بین نتایج دو روش تشخیصی را نشان داد.

#### تعیین توالی محصول PCR: در جدول ۱، نام گونه تأیید

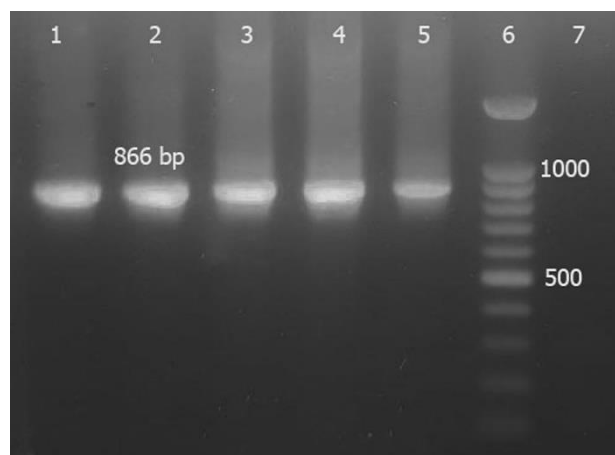
شده، عدد دسترسی در بانک ژنی و درصد شباهت باکتری‌های مورد بررسی آمده است. دو توالی بررسی شده با توالی‌های آناپلازما مارژیناله از بانک ژن مذکور مطابقت داشتند. به گونه‌ای که در مورد آناپلازما مارژیناله مربوط به طحال، با توالی ثبت شده در بانک ژنی با شماره دسترسی KY523019.1، ۹۹ درصد شباهت و آناپلازما مارژیناله مربوط به خون با توالی ثبت شده در بانک ژنی با شماره دسترسی KY522982.1، ۱۰۰ درصد تشابه داشت.

#### نتایج شاخص‌های خونی: مقایسه میانگین شاخص‌های

هماتولوژی PCV، HG، RBC و WBC بر اساس نتایج PCR خون و گسترش میکروسکوپی نشان داد که در دام‌های آلوده و غیر آلوده تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ )، (جدول ۲).

#### بحث

در مطالعه حاضر گاو میش‌ها آلوده به گنجیدگی شبه آناپلاسمایی تشخیص داده شد. در مطالعه Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۶، بررسی گسترش خونی از ۱۶۰ رأس گاو، نشان داد که ۱۹/۴ درصد به آناپلازما مارژیناله آلوده بودند (۱۷). مطالعه Rajapat و همکاران در سال ۲۰۰۵ از گسترش میکروسکوپی



تصویر ۱. محصول PCR نمونه‌های خون و طحال روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک‌های شماره ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت خون، چاهک شماره ۴ نمونه کنترل مثبت، شماره ۵ نمونه مثبت طحال، شماره ۶ مارکر مولکولی ۱۰۰ bp، شماره ۷ کنترل منفی.

#### نتایج

نتیجه ارزیابی میکروسکوپی گسترش خونی ۱۰۳ نمونه خون گاو میش مورد مطالعه نشان داد که ۱۶ رأس (۱۵/۵ درصد) آلوده به اجرام شبه آناپلاسمایی بودند.

#### نتایج مولکولی و ارتباط آن با نتایج گسترش میکروسکوپی:

در آزمایش مولکولی از ۱۰۳ نمونه خون گاو میش، ۳۲ نمونه (۳۱/۱ درصد) مثبت بودند. همچنین ۲ نمونه (۱/۹ درصد) از ۱۰۳ نمونه طحال گاو میش‌های مورد بررسی نیز در آزمایش PCR آناپلازما مارژیناله مثبت شدند. محصول PCR مرحله دوم آناپلازما به اندازه مورد انتظار و یک باند مشخص ۸۶۶ bp بود (تصویر ۱). دو رأس گاو میشی که در آزمایش PCR طحال مثبت بودند، نتیجه PCR خون آن‌ها نیز مثبت گزارش گردید. از ۳۲ رأس گاو میشی که در آزمایش PCR خون آلوده بودند، ۹ رأس در

مارژیناله ۱۷/۳ درصد گزارش شده است (۲۲). شیوع *آنپلازما مارژیناله* با آزمایش Nested-PCR روی ۵۰۰ رأس گاومیش در برزیل، ۵/۴ درصد تعیین شده است (۲۰). مقادیر آلودگی به *آنپلازما مارژیناله* در مطالعات فوق الذکر: ۸ درصد (۱۹)، ۱۷/۳ درصد (۲۲)، و ۵/۴ درصد (۲۰) کمتر از مقدار آلودگی (۳۱/۱ درصد) به روش PCR در مطالعه حاضر می‌باشند. این اختلاف‌ها ممکن است متأثر از تفاوت نژادی گاومیش‌ها، استفاده از ژن‌های متفاوت در PCR و نمونه‌گیری در فصول متفاوت باشد (۱۴، ۱۹، ۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که گاومیش می‌تواند مخزن طبیعی عفونت به *آنپلازما مارژیناله* باشد و نقش با اهمیتی در اپیدمیولوژی و انتشار *آنپلازما* در بین جمعیت گاوها داشته باشد (۲۱). با توجه به میزان آلودگی قابل توجه ۳۱/۱ درصد گاومیش‌های کشتار شده در مطالعه حاضر، می‌توان نقش احتمالی گاومیش به عنوان مخزنی قابل توجه برای حفظ عامل بیماری و انتقال آن به گاو مطرح باشد. میزان آلودگی گزارش شده به *آنپلازما مارژیناله* با روش PCR در مطالعات انجام شده روی گاو توسط Shayan و Noaman در سال ۲۰۱۰، (۳۸/۶ درصد) و نیز Singh و همکاران در سال ۲۰۱۲، (۴۵/۲ درصد) بیشتر از مطالعه حاضر و حتی بیشتر از میزان آلودگی گاومیش در سایر مطالعات بود (۲۰).

مطالعه ملکولی بافت طحال و خون گاومیش‌های مورد مطالعه مثبت بودند. مطالعه مشابهی در ایران در زمینه PCR یا دیگر روش‌های تشخیص بافتی برای *آنپلازما مارژیناله* در گاو و گاومیش یافت نشد. اما در مطالعه Eddlestone و همکاران در سال ۲۰۰۶ که به صورت تجربی ۴ قلاده سگ را به *آنپلازما پلاتیس* آلوده کردند، با استفاده از PCR خون، طحال و مغز استخوان مشاهده شد که در ۵۰ درصد موارد *آنپلازما پلاتیس* ردیابی شد. یک فرضیه که در این مطالعه مطرح بود، نقش احتمالی طحال در تسریع فاگوسیتوز گلبول‌های قرمز آلوده به باکتری و حذف سریع آن‌ها از گردش خون قبل از تکثیر زیاد عامل بیماری در گلبول قرمز آلوده بود. محققین نقش پاسخ‌های سایتوکاینی در مقاومت به *آنپلازما* در گاومیش را مرتبط دانسته‌اند (۱۳). در صورتی که میزان آلودگی در طحال بیش از آلودگی خون می‌بود، نتایج می‌توانست در پذیرفتن نقش احتمالی طحال در پیشگیری از بیماری بالینی کمک کننده باشند. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تعداد بسیار اندکی از نمونه‌های طحال در مقایسه با

۲۵۰ رأس گاو و ۲۵۰ رأس گاومیش در لاهور پاکستان به ترتیب ۲۲ و ۱۳/۶ درصد آلودگی به *آنپلازما مارژیناله* را نشان داد. Khan و همکاران در سال ۲۰۰۴ شیوع *آنپلازما مارژیناله* توسط گسترش خونی در گاو را ۱۷/۳ درصد و در گاومیش ۱۳ درصد به ثبت رسانده‌اند. در هیچ یک از آلودگی‌های فوق نشانه‌های بالینی در گاومیش‌ها گزارش نشده است. بررسی گسترش میکروسکوپی نمونه‌های خون ۱۵۰ رأس گاو از استان اصفهان، ۱۰/۶ درصد آلودگی به *آنپلازما مارژیناله* را نشان داد (۱۵). نتایج تمام مطالعات ذکر شده در بالا از نظر میزان آلودگی تقریباً با نتیجه میزان آلودگی به روش گسترش میکروسکوپی در مطالعه موجود هم‌خوانی دارد.

شیوع *آنپلازما مارژیناله* در گاومیش در هند با استفاده از گسترش میکروسکوپی، صفر درصد گزارش شد (۲۴). میزان آلودگی گزارش شده در این مطالعه با میزان آلودگی در مطالعه حاضر مطابقت نداشت. صرف نظر از عوامل متعددی از جمله روش تهیه و رنگ‌آمیزی گسترش، نوع مواد مورد استفاده و مهارت در تشخیص به این روش نیز ممکن است در تعیین میزان آلودگی اثرگذار باشد. نتایج مطالعه Vahora و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه حاضر هم‌راستا نبود (۱۰، ۱۶، ۱۷). قطعاً چنین نتایجی که فقط با بررسی‌های میکروسکوپی به دست آمده است از دقت کمتری برخوردار است، زیرا علاوه بر آن که این روش در موارد مزمن بیماری و دام‌های حامل پاسخگو نیست، بلکه ارگان‌سیم‌های *آنپلازمایی* فاقد ویژگی‌های ریخت‌شناسی متمایز کننده هستند و در میزان کم پارازیتی ممکن است از اجسام هاول جولی و یا رسوب رنگ قابل تفریق نباشند (۳).

بررسی PCR به عنوان یک روش دقیق‌تر جهت شناسایی و تفریق گونه‌های *آنپلازما* در حیوانات حامل، نشان از حضور آلودگی به *آنپلازما مارژیناله* در گاومیش‌های مورد مطالعه فاقد علایم بالینی داشت. محققین متعددی از این روش جهت شناسایی و تفریق گونه‌های *آنپلازما* در حیوانات حامل و نیز ناقلین کنه‌ای استفاده نموده‌اند (۶، ۱۵، ۲۳). روش PCR با پرایمرهایی از ژن اپران groEL برای تشخیص گونه‌های *آنپلازما* استفاده شده است (۲۲). در این مطالعه نتایج آزمایش PCR نشان داد که نمونه‌های خون و طحال آلوده به *آنپلازما مارژیناله* بودند. Saetiew و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تایلند میزان آلودگی گاومیش به *آنپلازما مارژیناله* را ۸ درصد تعیین کرده‌اند. در یک بررسی به روش PCR در آفریقای جنوبی میزان آلودگی گاومیش به *آنپلازما*



گاو میش رودخانه‌ای با گونه آلوده کننده و بیماریزای آن در گاو انجام مطالعات مولکولی مربوطه، ضروری به نظر می‌رسد. توصیه می‌شود که در مطالعات آینده میزان باکتری می با استفاده از مطالعات مولکولی کمی در گاوها و گاو میش‌های آلوده حامل (به ظاهر سالم) مورد بررسی قرار گیرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بخاطر تأمین هزینه‌های این مطالعه که مستخرج از پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی می‌باشد، ابراز می‌نمایند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

نمونه‌های خون در آزمایش PCR، آلوده بودند، لذا چنین نقشی برای طحال مفروض نیست. تحقیقات نشان داده است که در طی فاز حاد ابتلا به آناپلازما مارژیناله در گاو میزان پارازایتمی ممکن است فراتر از  $10^9$  اریتروسیت آلوده در هر میلی‌لیتر خون برسد (۱۱). میزان پارازایتمی در گاوهای حامل نیز از  $10^3$  تا  $10^5$  اریتروسیت عفونی در هر میلی‌لیتر خون گزارش شده است (۴). این میزان در گاو میش‌های آلوده بررسی نشده است. یک دلیل احتمالی دیگر که ممکن است گاو میش در مقابل گاو به بیماری مبتلا نشود این است که ممکن است میزان باکتری می در گاو میش‌های مبتلا به حدی نرسد که منجر به بیماری بالینی شود.

**نتیجه‌گیری:** نظر به میزان آلودگی قابل توجه گاو میش‌های کشتار شده به آناپلازما مارژیناله، می‌توان نقش احتمالی گاو میش به عنوان مخزن برای حفظ عامل بیماری و انتقال آن به گاو مطرح باشد. بنابراین، در خصوص ارتباط بین گونه آناپلازما مارژیناله در

### References

- Aubry, P., Geale, D.W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*, 58(1), 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Borghese, A. (2005) Buffalo production and research. (1<sup>st</sup> ed.) FAO of the United Nations, Rome, Italy. p. 1-5.
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet Microbiol*, 124(1-2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.022>
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H., Grunberg, W. (2017). *Veterinary Medicine*. (11<sup>th</sup> ed.) Elsevier Ltd. Philadelphia, USA. p. 769-775.
- De La Fuente, J., Golsteyn Thomas, E.J., Van Den Bussche, R.A., Hamilton, R.G., Tanaka, E.E., Druhan, S.E., Kocan, K.M. (2003). Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 5001-5005. PMID: [12902301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12902301/)
- De La Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., Fernandez de Mera, I. G., Villanua, D., Almazan, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K. M., Gortazar, C. (2005). Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 5(4), 390-401. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.390>
- Farhoomand, P. (2000). Buffalo Production. (2<sup>nd</sup> ed.) Urmia University Press, Urmia, Iran. p. 1-15.
- Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufile, J.P., Raoult, D., Brouqui, P. (2002). Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(5), 1132-1136. PMID: [12204973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12204973/)
- Jassem, G.A., Aagaar, O.A. (2015). Molecular and biochemical study of *Anaplasma marginale* in cattle in Wassit province of Iraq. *J Bacteriol Res*, 7(4), 36-41. <https://doi.org/10.5897/JBR2014.0142>
- Khan, M.Q., Zahoor, A., Jahangir, M., Mirza, M.A. (2004). Prevalence of blood parasites in cattle and buffaloes. *Pak Vet J*, 24(4), 193-194.
- Kieser, S.T., Eriks, I.S., Palmer, G.H. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Infect Immun*, 58(4), 1117-1119. PMID: [2318532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2318532/)
- Kocan, K.M., De La Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev*, 16(4), 698-712. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>
- Mingala, C.N., Konnai, S., Cruz, L.C., Onuma, M., Ohashi, K. (2009). Comparative moleculo-immunological analysis of swamp- and riverine-type water buffaloes responses. *Cytokine*, 46(2), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.02.006>
- Mushtaq, A., Durrani, A.Z., Mushtaq, A., Parveena, S., Raanaa, W., Rafiquea, R., Azeem, T., Umair, S. (2015). Molecular diagnosis of bovine Anaplasmosis in district Lahore. *Veterinaria*, 1(1), 7-12.
- Noaman, V., Shayan, P. (2010). Comparison of microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iran J Microbiol*, 2(2), 89-94. PMID: [22347555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22347555/)
- Rajput, Z.I., Hu, S.H., Arijio, A.G., Habib, M., Khalid, M. (2005). Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6(11), 1057-1062. PMID: [16252338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16252338/)
- Razmi, G.R., Dasrjerdi, K., Hosseini, H., Naghibi, A., Barati, F., Aslani, M.R. (2006). An epidemiological study on Anaplasma infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad suburb, Khorasan province, Iran. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 479-481. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.089>
- Rymaszewska, A., Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* - characteristics of Anaplasma and their vectors: a review. *Vet Med*, 53(11), 573-584.

19. Saetiew, N., Simking, P., Inpankaew, T., Wongpanit, K., Kamyngkird, K., Wongnakphet, S., Stich, R.W., Jittapalapong, S. (2015). Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* infections in water buffaloes in Northeast Thailand. *J Trop Med Parasitol*, 38, 9-16.
20. Silva, J.B., Vinhote, W.M.S., Oliveira, C.M.C., André, M.R., Machado, R.Z., da Fonseca, A.H., Barbosa, J.D. (2014a). Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in northern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(2), 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.09.007>
21. Silva, J.B., Fonseca, A.H., Barbosa, J.D., Cabezas-Cruz, A., de la Fuente, J. (2014b). Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in Marajó Island, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(6), 801-804. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.06.003>
22. Sisson, D., Hufschmid, J., Jolles, A., Beechler, B., Jabbar, A. (2017). Molecular characterisation of *Anaplasma* species from African buffalo (*syncerus caffer*) in kruger national park, South Africa. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(3), 400-406. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.01.003>
23. Torina, A., Galindo, R.C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., Fiasconaro, M., Scimeca, S., Alongi, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., de la Fuente, J. (2010). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. *Trop Anim Health Prod*, 42(7), 1327-1331. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9580-8>
24. Vahora, S.P., Patel, J.V., Patel, B.B., Patel, S.B., Umale, R.H. (2012). Seasonal incidence of haemoprotozoal diseases in crossbred cattle and buffalo in Kaira and Anand districts of Gujarat, India. *Vet World*, 5(4), 223-225. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.223-225>
25. Ybanez, A.P., Sivakumar, T., Ybanez, R.H.D., Ratilla, J.C., Perez, Z.O., Gabotero, S.R., Inokuma, H. (2013). First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. *J Vet Med Sci*, 75(1), 27-36. PMID: [22878542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22878542/)
26. Yu, X.J., Zhang, X.F., McBride, J.W., Zhang, Y., Walker, D.H. (2001). Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and '*Ehrlichia platys*' to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(3), 1143-1146. PMID: [11414267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11414267/)
27. Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C. (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu Rev Microbiol*, 45, 301-325. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.001505>



## Moleccular and Hematologic Survey on *Anaplasma marginale* Infection in Slaughtered Water Buffaloes (*Buballous buballis*) in Ahvaz City, Iran

Ali Abbas Nikvand<sup>1</sup>, Ehsan Hasanpour Besati<sup>2</sup>, Darioush Gharibi<sup>3</sup>, Seyedeh Missagh Jalali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

doi [10.22059/jvr.2019.263796.2837](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.263796.2837)

Received: 11 December 2019, Accepted: 10 February 2020

### Abstract

**BACKGROUND:** There is paucity of information about *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) infection in water buffaloes and there have not been any reports of clinical anaplasmosis in the buffaloes in Iran.

**OBJECTIVES:** Moleccular and hematologic survey on *A. marginale* infection in apparently healthy buffaloes referring to Ahvaz abattoir.

**METHODS:** Samples of blood and spleen tissue were obtained from 103 healthy buffaloes referring to the slaughterhouse. Blood samples were subjected to microscopic examination and PCR assay while spleen specimens were only analyzed by PCR. In this study, a nested-PCR method was used to amplify a fragment of the groEL gene of the bacterium.

**RESULTS:** According to PCR, 31.1% and 1.9% of examined blood and spleen samples were found positive for *A. marginale*, respectively. The buffaloes which were positive in spleen tissue PCR test were positive in blood PCR, as well. Microscopically, Anaplasma-like organisms were found in 15.5% of stained blood smears. There was a slight Kappa agreement between stained blood smears and PCR. No significant difference was found in hematologic values between the infected and non-infected buffaloes based on PCR results.

**CONCLUSIONS:** Significant occurrence of infection with *A. marginale* in the studied buffaloes can indicate the probable role of buffalo as a reservoir of the disease agent and its transmission to the cattle.

**Keywords:** *Anaplasma marginale*, GroEL, PCR, Spleen, Water buffalo

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: [a.nikvand@scu.ac.ir](mailto:a.nikvand@scu.ac.ir) Tel/Fax: 061-33330073 / 061-33360807

### How to cite this article:

Nikvand, A., Hasanpour Besati, E., Gharibi, D., Jalali, S. (2020). Moleccular and Hematologic Survey on *Anaplasma marginale* Infection in Slaughtered Water Buffaloes (*Buballous buballis*) in Ahvaz City, Iran. J Vet Res, 75(2), 192-199. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.263796.2837>

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** The sequences of primers to identify *Anaplasma marginale* infection in examined buffaloes.

**Table 2.** PCR and blood smear findings (mean ± SD) in examined buffaloes.

**Figure 1.** PCR products of blood and spleen of infected water buffaloes using 1% agarose. Lanes 1-3: infected blood samples, lane 4: positive control, lane 5: infected spleen sample, lane 6: 100-bp DNA ladder, lane 7: negative control.