تشخیص *آناپلاسما اوویس* بر اساس ژن ۱۶SrRNA با روش PCR-RFLP در گوسفندان قسمت مرکزی ایران

نعمان، و.*[۱]، شایان، پ.[۲،۳]، شاهمرادی، ا.ح.[۱]

دریافت: ۱۳۸۸/۵/۲۶ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۴

خلاصه:

واکنش زنجیره ای پلیمراز یکی از اختصاصی ترین روش های تشخیص تفریقی گونه های *آناپلاسما* می باشد. واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس ژن ۱۶S rRNA می تواند گونه های جنس آناپلاسما را از یکدیگر تفریق نماید ولی توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA در آناپلاسما اوویس بسیار شبیه به *آناپلاسما مارجیناله* می باشد(۹۹/۹٪تا ۹۹/۲٪) و طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر این دو گونه غیر ممکن است.

گوسفند و بز می توانند با *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* آلوده شوند، بنابراین هدف مطالعه حاضر طراحی و بکارگیری آزمون PCR-RFLP در تشخیص اختصاصی گونه های مذکور بر اساس ژن ۱۶S rRNA در گوسفند و بز می باشد.

در این مطالعه ۱۵۰ نمونه خون و اسمیر خونی از گوسفندان بدون علایم بیماری گوسفند داری های اطراف اصفهان که سابقه بیماری های منتقله از کنه را داشته اند تهیه شد. در ابتدا گسترش های خونی با گیمسا رنگ آمیزی شدند و از نمونه های خونی که در گسترش خونی دارای نقاط حاشیه ای در گلبولهای قرمز بودند DNA استخراج شد. DNA استخراج شده با آزمون semi-nested PCR اختصاصی برای گونه های *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* وآزمون PCR-RFLP، با استفاده از آغازگرهای مشتق از ژن۱۶S rRNA و آنزیم اندونوکلئاز (FunD II MvnI)مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنزیم اندونوکلئاز(FunD II) MvnI توالی (CGCG) را

۱-بخش دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
۲-مرکز تحقیقات کنه و بیماریهای منتقله از آن، دانشکده دامپزشکی تهران
۳-واحد پژوهشی انتقال سیستمهای بیولوژی ملکولی
* نویسنده مسئول:vnoaman@gmail.com

محصول semi-nested PCR مربوط به *آناپلاسما اوویس*،مورد شناسایی قرار می دهد و در موقعیت نوکلئوتید ۷۰ محصول مورد نظر را می برد. در حالی که این آنزیم نمی تواند محصول semi-nested PCR مربوط به آناپلاسما مارجیناله(TACG) را برش دهد. آزمون ساده semi-nested PCR و متعاقب آن PCR-RFLP بر اساس ژن ۱۶S rRNA قادر است در کمترین زمان *آناپلاسما اوویس* را شناسایی و از *آناپلاسما مارجیناله* تفریق کند و این روش در تحقیقات اپیدمیولوژی و روش های کنترلی مفید و قابل استفاده می باشد.

واژه های کلیدی: *آناپلاسما اوویس*، PCR-RFLP، semi-nested PCR، گوسفند، ایران

مقدمه :

گونه های جنس *آناپلاسما* (راسته ریکتزیاله و خانواده *آناپلاسماتاسه آ*) عوامل داخل سلولی اجباری می باشند که از طریق کنه منتقل شده و آناپلاسموز را در گاو، گوسفند، بز و سایر نشخوار کنندگان ایجاد می کنند (Dumler وهمکاران، ۲۰۰۱)آناپلاسموز گاوی ایجاد شده بوسیله *آناپلاسما مارجیناله* یکی از مهمترین بیماری های گاو در سراسر دنیا است و باعث ضررهای اقتصادی زیادی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می شود (Kocan و همکاران، ۲۰۰۰; Kocan و همکاران، ۲۰۰۳) درحالی که آناپلاسما اوویس در گوسفندان اهلی باعث عوارض شدید بیماری نمی شود و این عامل برای گاو بیماری زا نیست (de la Fuente و همکاران، ۲۰۰۵).

تشخیص *آناپلاسما اوویس* بطور معمول با در نظر گرفتن میزبان و با تشخیص گنجیدگی هایی که بطور حاشیه ای در گلبول های قرمز قرار گرفته اند انجام می شود (Liu و همکاران، ۲۰۰۵). رنگ آمیزی گسترش های خونی با گیمسا می تواند به عنوان روشی مناسب جهت تشخیص گونه های *آناپلاسما* در میزبان هایی که علایم حاد بیماری را نشان می دهند بکار گرفته شود، ولی این روش در تشخیص حیوانات حامل و حیواناتی که بیماری مزمن دارند کاربرد ندارد (Carelli و همکاران، ۲۰۰۷).

جهت تشخیص گونه های مختلف آناپلاسما چندین آزمون سرمی طراحی شده است ولی بخاطر واکنش های متقاطع بین گونه ای این آزمون ها در تفریق آلودگی گونه های مختلف ناتوان می باشند (Kocan و همکاران، ۲۰۰۳ ; Bradway و همکاران، ۲۰۰۱; Dreher و همکاران، ۲۰۰۵; Scoles و همکاران، ۲۰۰۸; Torina و Caracappa، ۲۰۰۷).

تا کنون چندین روش تشخیص ملکولی جهت شناسایی گونه های *آناپلاسما* طراحی شده است ولی طراحی روشی با حساسیت و ویژگی بالا که بتواند گونه های مختلف *آناپلاسما* را تفریق نماید ضروری است (Lew و Jorgensen، ۲۰۰۵; Bekker و همکاران، ۲۰۰۲; Molad وهمکاران، ۲۰۰۶).

واکنش زنجیره ای پلی مراز بر اساس ژن ۱۶S rRNA می تواندگونه های مختلف جنس آناپلاسما را تفریق نماید (Liu و همکاران، ۲۰۰۵). اما توالی نوکلئوتیدی *آناپلاسما اوویس* بسیار شبیه به *آناپلاسما مارجیناله* می باشد. توالی نوکلئوتیدی *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* در قسمت بسیار متغیر ژن ۱۶S rRNA تنها در دو نوکلئوتید تفاوت دارند و طراحی آغازگرهای اختصاصی که بتواند این دو گونه را از یکدیگر تفریق نماید غیر ممکن است. هدف مطالعه اخیرطراحی آزمون اختصاصی PCR-RFLP بر اساس ژن ۱۶S rRNA و تفریق بین *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* در گوسفند و بز می باشد زیرا آزمون های مولکولی که در گذشته طراحی شده اند در این مورد توفیقی نداشته اند.

مواد و روش کار:

جمع آوری نمونه:

بر اساس مطالعات قبلی، نمونه گیری درقسمت مرکزی ایران (اطراف اصفهان) در مناطقی انجام گرفت که حضور ناقلین بندپا (کنه، مگس های گزنده) در آن مناطق قبلاً گزارش شده بود. براین اساس تعداد ۳۰ گوسفند داری در این مناطق انتخاب شد. سپس در هر دامداری بطور تصادفی از ۵ راس دام و از هر کدام ۵ میلی لیتر خون از ورید وداج اخذ و در

لوله های حاوی ماده نگهدارنده (اتانول ۷۰٪) جمع آوری شـد. علاوه بر این از هر دام ۲ گسترش خونی نازک نیز تهیه شد که پس از خشـک شـدن و کدگذاری درکاغذ سفید پیچیده وکلیه نمونـه ها جهت آزمایش های بعدی به آزمایشـگاه گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد.

در آزمایشگاه لام های خونی با استفاده از متانول خالص به مدت ۵ دقیقه ثابت شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه با محلول گیمسا رنگ آمیزی شدند. در هر گسترش خونی به وسیله میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰ شیئی، گلبول های قرمز (۵۰ فیلد میکروسکوپی) از نظر وجود*آناپلاسـما/وویس* مـورد ارزیابی قرار گرفتند. ۵۰ نمونه خونی که در بررسی میکروسکوپی مثبت ارزیابی شده بودند جهت استخراج DNA مورداستفاده قرار گرفتند.

استخراج AND از خون:

ابتـدا مقـداری از نمونه خـون نگهداری شـده در اتانول ۷۰٪ را از لوله خارج کرده سـپس تقریباً ۵ میلی متر مکعب از نمونـه مذکـور را جدا نموده و در داخـل تیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری انداخته تا الکل نمونه کاملاً خشـک شود، سپس با استفاده از کیت (MBST, Iran)، استخراج DNA طبق دسـتورالعمل شـرکت انجام گرفت.

RCP اولیه:

PCR اولیه برای تشـخیص جنس *آناپلاسـما* بدون در نظر داشـتن گونه خاصی انجـام گرفت. بدین منظور با اسـتفاده از توالـی نوکلئوتیدهای قسـمتی از ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسـما مارجینالـه* و *آناپلاسـما اوویس* که در بانک ژن با شـماره های M۶۰۳۱۳ و AF۳۱۸۹۴۵ در دسـترس بود، جفت آغازگر P۱/ P۲تهیه شـد که ترادف نوکلئوتیـدی آن در تمامی گونه های آناپلاسـما وجود دارد (جدول شـماره ۱). بانـد حاصله از تکثیر در اثـر ایـن جفت آغازگر پـس از PCR در همـه گونه ها در حدود ۷۸۱جفت باز خواهد بود. محصول تکثیر شده توسط این جفت آغازگر دربرگیرنده قطعه بسـیار متغیرHyper Variable Region V۱ از ژن ۱۶S rRNA جنس *آناپلاسما* است.

بـرای همه نمونه هـا یک کنترل منفـی (آب مقطر به جای نمونه) و یک کنترل مثبت (*آناپلاسـما مارجینالـه*) در نظر گرفته شد. بعد از آماده سـازی محلول ها در تیوب اپندورف ۲۰۰µl، این تیوبها در دسـتگاه ترموسـیکلرMWG, Germany قرار گرفته و تحت برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت.

Heated Lid	110°c		
Denaturation step	95 °c	5'	
Denaturation step	94 °c	45"	40-35 Cycle
Annealing step	56 °c	45"	
Extension step	72 °c	45"	
Extention (End)	72 °c	10'	

Nested RCP جهـت تاییـد تشـخیص قطعه تکثیر شده درPCR اولیه:

جهـت تایید قطعه تکثیر شـده در PCR اولیه که توسـط آغازگرهـای P۱/P۲ تکثیـر می شـد، دو آغازگرP۴/P۳در داخل قطعه تکثیر شـده طراحی گردید. تکثیر توسط این دو آغازگـر اگرچه گونه خاصی از آناپلاسـما را تکثیر نمی کرد و جنس *آناپلاسـما* را تشـخیص می داد ولی به جهت تایید تشـخیص DNA تکثیری در محصـول اولیه و اطمینان از عـدم تکثیر DNA ارگانیسـم های دیگـر و واکنش های مثبـت کاذب ضـروری بـود (جـدول شـماره ۱). درقطعه تکثیـری حاصـل از آغازگرهـای P۴/P۳، ۵۴۳bp

جدول ۱ : مشخصات آغازگرهای PCR، Nested PCR و Semi – Nested PCR تکثیر کننده *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله*

Primer	Accession No. in GenBank	Nucleotid sequences	positions	PCR-product size(bp)	Identification
P۱	M60313 AF318945	۵` agagtttgatcctggctcag 3`	۲۰-۱	۷۸۱bp	*Anaplasma species*
P۲	M60313 AF318945	۵` agcactcatcgtttacagcg 3`	762–781		
P۳	M60313 AF318945	۵'gcaagcttaacacatgcaagtc۳'	۵۶-۳۵	۵۴۳bp	*Anaplasma species*
P۴	M60313 AF318945	۵'gttaagccctggtatttcac۳	۵۵۸-۵۷۷		
P۱	M60313 AF318945	۵` agagtttgatcctggctcag 3`	۲۰-۱	۱۲۰bp	*A. ovis/ A. marginale*
P۵	M60313 AF318945	۵`ctatgcattactcacccgtctgccac taaccatacacgcagcaagctgcg ۳`	71–120		

قسمت بسیارمتغیرژن ۱۶S rRNAنیز تکثیر می شود بنابر این از قطعه مذکور نیز می توان در جهت تشخیص گونه استفاده نمود.

تشخیص *آناپلاسما اوویس* با روش Semi-Nested PCR و PCR- RFLP :

از آنجا که نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغیر V۱ ژن ۱۶S rRNA در *آناپلاسما مارجیناله* و *آناپلاسما اوویس* دارای تفاوت قابل ملاحظه ای نمی باشند و تنها در دو باز با هم تفاوت دارند لذا طراحی آغازگرهای اختصاصی برای هر گونه غیر ممکن است. به همین دلیل ابتدا سعی شد که دو گونه *آناپلاسما مارجیناله* و *آناپلاسما اوویس* از دیگر گونه های آناپلاسما متمایز گردند. برای این منظور آغازگر P۵ طراحی شد که بتواند فقط ژن ۱۶S rRNA دو گونه آناپلاسما مارجیناله و *آناپلاسما اوویس* را تکثیر نماید. در این تکثیر آغازگر P۱ به عنوان آغازگر senseاستفاده شد(جدول شماره ۱). محصول مورد انتظار حاصل از تکثیر این دو آغازگر و با استفاده از محصول PCR اولیه (۷۸۱bp) به عنوان نمونه، باندی در حدود ۱۲۰bpبود.

توالی (CGCG)تنها در قسمت بسیار متغیر V۱ از ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسما اوویس* وجود دارد و توسط آنزیم اندونوکلئاز MvnI (FunD II) شناسایی می شود.

در صورت وجود ژنوم *آناپلاسما اوویس*، پس از انکوباسیون نمونه با آنزیم به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °c، آنزیم اندونوکلئاز MvnI باید توالی CGCGرا در گونه *آناپلاسما اوویس* شناسایی، و باعث بریده شدن محصول Semi– nested PCR ۱۲۰bpبه دو قطعه با اندازه های ۷۰bp و ۵۰bpشود .علاوه بر این محصولات ۱۲۰bp تحت تاثیر آنزیم اندونوکلئاز Bst۱۱۰۷I (Roche, Germany) نیز قرار گرفتند. این آنزیم تنها توالی GTATAC را در *آناپلاسما مارجیناله* تشخیص داده و باعث برش قطعه DNA *آناپلاسما مارجیناله* در موقعیت ۶۸ می شود.

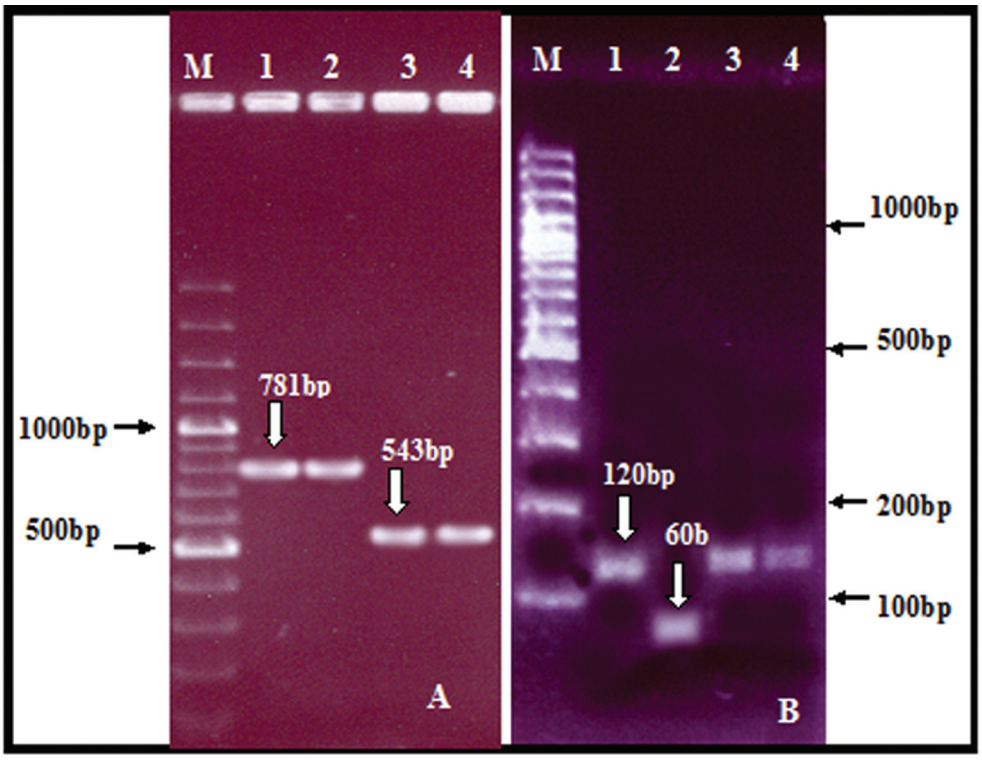
نتایج:

در بررسی گلبول های قرمز گسترش های خونی تهیه شده مشخص شد که در ۵۰ (۳۳/۳۳٪) گسترش خونی اجسام شبه آناپلاسمایی در حاشیه گلبول های قرمز مشاهده می شوند.

DNA استخراجی از ۵۰ نمونه مثبت هم زمان با آزمون های PCR و Nested PCR مـورد تجزیـه و تحلیل قرار گرفت و به ترتیب باند ۷۸۱bp و ۵۴۳bp ایجاد شـد که نشان می دهد کلیه نمونه ها از نظر جنس *آناپلاسـما* مثبت می باشند (تصویر شماره۱-A).

در آزمـون semi-Nested PCR کلیـه نمونه ها با آغازگرهای P۵/P۱ تکثیر شده و باند ۱۲۰bp ایجاد کردند که نشان می دهد کلیه نمونه ها از نظر *آناپلاسما اوویس*، *آناپلاسما مارجیناله* مثبت می باشند.

جهت تعیین *آناپلاسما اوویس* و تفریق از *آناپلاسما مارجیناله* از آزمون PCR-RFLP اسـتفاده شـد و محصول تکثیری ۱۲۰bp در معـرض آنزیـم اندونوکلئـاز FunD II(MvnI) قرار گرفت کـه این آنزیـم در تمامی نمونه ها باعث بریده شـدن محصول ۱۲۰bp شد .بنابر این تمامی ۵۰نمونه مورد آزمایش از نظر آلودگی با *آناپلاسـما اوویس* مثبت بودند (تصویر شماره ۱-B). علاوه بر این محصولات ۱۲۰bp تحت تاثیر آنزیم اندونوکلئاز Bst۱۱۰۷I (Roche, Germany) نیز قرار گرفتند. که در هیچ یک از نمونه ها، باعث بریده شـدن محصول تکثیر شـده با جفت آغازگر P۱/ P۵ نشد و کلیه نمونه ها از نظر *آناپلاسما مارجیناله* منفی بودند (تصویر شماره ۱-B).

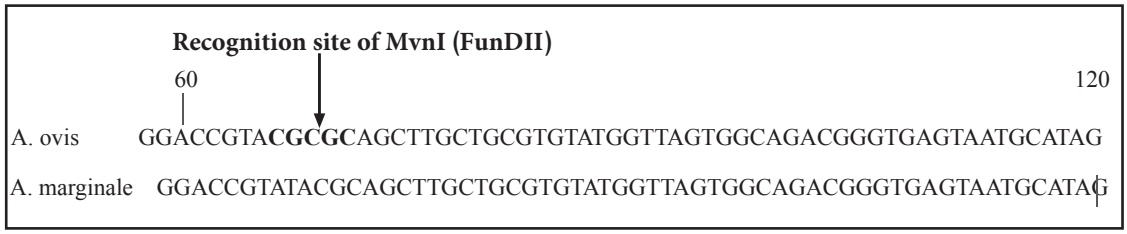


تصویر ۱: محصولات PCR، Nested PCR ، Semi -Nested PCR و PCR-RFLP

A :۱و ۲ نمونه های DNAتکثیر شده با جفت آغازگر P۲/P۱ (محصول۷۸۱bp ۳،) و ۴ نمونه های PCR اولیه و تکثیر شده با جفت آغازگر(P۳/P۴ محصول۵۴۳bp)

B: ۱و۳ نمونه های PCR اولیه و تکثیر شده با جفت آغازگر(P۱/P۵ محصول۱۲۰bp) به ترتیب مربوط به آناپلاسما اوویس و آناپلاسما مارجیناله ،۲ محصول ۱۲۰bp آناپلاسما اوویس تحت تاثیر آنزیمMvnI(FunD II) قرار گرفته و بریده شده، ۴ محصول ۱۲۰bp آناپلاسما مارجیناله تحت تاثیر آنزیم MvnI(FunD II) قرار گرفته و بریده نشده است.

M: مارکر ۱۰۰bp



تصویر ۲: ردیف توالی نوکلئوتیدهای (۱۲۰-۶۰) ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله*. محل شناسایی آنزیم MvnI (FunDII) در DNA *آناپلاسما اوویس* با فلش مشخص شده است.

بحث :

در ایـران آناپلاسـموز گاوی بیماری مهمی اسـت که باعث ضررهـای زیادی بـه صنعت گاوداری کشـور می شـود ولی آناپلاسـموز گوسفندی معمولاً باعث بیماری شدید نمی شود و تنها در برخی از موارد گوسـفندان در معرض استرس یا عوامل مسـاعدکننده، نشانه های بالینی آناپلاسموز را نشان می دهند. در دام هایـی که بـه نحوی با گونه های آناپلاسـما آلوده می شـوند این آلودگی باعث عفونت پایدار در دام شده و می تواند خطر بالقوه ای برای حیوان و صنعت دامداری باشـد (Eriks و همکاران، ۱۹۸۹).

آناپلاسما اوویس و *آناپلاسما مارجیناله* از نظر ریخت شناسی، بیولـوژی، و انتقـال از طریق کنه مشـابهند ولـی در توانایی بیمـاری زایی در میزبـان های اختصاصی متفـاوت عمل می کنند. تلقیح *آناپلاسـما اوویس* به گوسـاله های طحال برداری شـده باعث گسـترش عفونت و نشـانه های بالینی نمی شود درصورتی که تلقیح *آناپلاسـما مارجیناله* به گوسـفندان طحال برداری شده باعث گسـترش عفونت در گوسفند می شود بنابر این *آناپلاسـما مارجیناله* توانایی آلوده کردن گوسـفند و گاو را دارد ولی آناپلاسما اوویس نمی تواند آلودگی پایدار در گاو ایجاد نماید (Kuttler، ۱۹۸۴). لذا تفریق دو گونه *آناپلاسـما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* در گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است.

Lew و همکاران در سـال ۲۰۰۳ نشان دادند که در گسترش های رنگ آمیزی شـده با گیمسـا گنجیدگی های *آناپلاسـما اوویس* و *آناپلاسـما مارجیناله* در حاشیه گلبول های قرمز قرار مـی گیرند و علی رغم اختلاف در میزبان های اختصاصی این دو گونـه، در آلودگی هـای توام تفریق ایـن دو گونه با روش میکروسکوپی در گسـترش های رنگ آمیزی شده غیر ممکن اسـت. علاوه بر این روش میکروسکوپی در حیوانات حامل نیز به دلیل میزان بسـیار کم گنجیدگی هـای داخل گلبولی قابل توصیه نیسـت و بـا این روش نمی توان اجسـام گنجیدگی را از اجرام رنگ، اجسـام هاول ژولی و اجسـام هینز تفریق نمود. تابحال چندین آزمون سرمی طراحی شده است ولی این آزمون ها نیز توانایی تفریق گونه های مختلف *آناپلاسما* را از یکدیگر ندارنـد (Bradway و همـکاران، ۲۰۰۱; Dreher و همکاران، ۲۰۰۵). روش های ملکولی با حساسیت و ویژگی بالا نیز طراحی شـده اند که می تواننـد DNA گونه های مختلف *آناپلاسـما* را تشـخیص دهنـد(Lew و Jorgensen، ۲۰۰۵; Bekker و همکاران، ۲۰۰۲; Molad وهمکاران، ۲۰۰۶).

de la Fuente و همکاران در سـال های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ در تجزیـه توالی های نوکلئوتیدی ژن msp4 *آناپلاسـما اوویس* نشـان دادند که این ژن در گوسـفند و دیگر نشـخوارکنندگان کوچک و نقاط جغرافیایی مختلف دارای تفاوت هایی اسـت که از این ژن می توان در تشخیص ایزوله های جغرافیایی مختلف استفاده نمود.

با طراحی آغاز گرهای اختصاصی بر اساس ژن ۱۶S rRNA می توان از این ژن در جهت تشخیص جنس *آناپلاسم*ا استفاده نمود و در آزمون Nested-PCR می توان گونه های مختلف را از یکدیگر تفریق نمود ولی بخاطر تشابه زیاد در نوکلئوتیدهای قسـمت بسـیار متغیر ژن ۱۶S rRNA در *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسـما مارجیناله* باطراحـی آغازگرهای اختصاصی و روش Nested-PCR نمـی توان این دو گونه را تشـخیص داد و از یکدیگر تفریق نمود.

مقایسه ردیف نوکلئوتیدهای ثبت شده ژن ۱۶SrRNA :

آناپلاسما اوویس:
(AF۳۱۸۹۴۵, AJ۶۳۳۰۴۹, AJ۶۳۳۰۵۰, AJ۶۳۳۰۵۱, و AJ۶۳۳۰۵۲)

آناپلاسما مارجیناله:
(AJ۶۳۳۰۴۸, AF۳۰۹۸۶۶, AF۳۰۹۸۶۸, AY۰۴۸۸۱۶, AF۳۰۹۸۶۷, AF۳۱۱۳۰۳, AF۴۱۴۸۷۷, AF۴۱۴۸۷۱, AF۴۱۴۸۷۴, AF۴۱۴۸۷۸, AF۴۱۴۸۷۲)

بانک ژن نشان می دهد که ردیف توالی نوکلئوتیدهای (۱۲۰-۱) *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* تنها در دو نوکلئوتید با هم متفاوتند و طراحی آغازگرهای اختصاصی غیر ممکن است (تصویر شماره ۲).

آغازگرهای P۵ /P۱ *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* را تکثیر می کنند ولی این دو گونه را از یکدیگر تفریق نمی کنند. Lew و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مقایسه ۱۳ ردیف توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسما مارجیناله* و ۲ ردیف توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسما اوویس* نشان دادند که ژن ۱۶S rRNA جهت تشخیص جنس مفید است ولی با این ژن نمی توان *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* را تفریق نمود. همچنین Liu و همکاران در سال ۲۰۰۵ توالی نوکلئوتیدی ژن۱۶S rRNA از چهار جدایه *آناپلاسما اوویس* و یک جدایه از *آناپلاسما مارجیناله* در چین را با ۱۹ ردیف توالی نوکلئوتیدی ژن مربوطه موجود در بانک ژن با هم مقایسه نمودند و نشان دادند که مشابهت نوکلئوتیدی بین ۹۹/۲ تا ۹۹/۹ درصد می باشد (Liu و همکاران، ۲۰۰۵).

Bekker و همکاران در سال ۲۰۰۲ آزمون Reverse Line Blot (RLB) را جهت تشخیص *آناپلاسما* و *ارلیشیا* بر اساس ژن ۱۶S rRNA طراحی نمودند ولی حساسیت این آزمون تاکنون تعیین نشده است و برای تشخیص حیوانات حامل مناسب نمی باشد، علاوه براین به علت تشابه بالای ردیف های نوکلئوتیدی با این آزمون نمی توان *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* را تفریق نمود (Molad و همکاران، ۲۰۰۶). Noaman و همکاران در سال ۲۰۰۹ در تشخیص مولکولی *آناپلاسما مارجیناله* در گاوهای حامل از ژن ۱۶S rRNA و آزمون PCR-RFLP استفاده نمودند که این روش با حساسیت بالایی نسبت به روش های رنگ آمیزی می توانست *آناپلاسما مارجیناله* را تشخیص داده و از دیگر گونه های *آناپلاسما* تفکیک نماید.

ضرورت تفریق بین *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* حضور همزمان این ارگانیسمها در کنه های ناقل می باشد زیرا کنه های ناقل این دو ارگانیسم مشترک می باشند علاوه بر این *آناپلاسما اوویس* و *آناپلاسما مارجیناله* می توانند همزمان در نشخوارکنندگان کوچک یافت شوند. بنابر این جهت تفریق این دو گونه آزمون RFLP با استفاده از آنزیم ندونوکلئاز MvnI (FunDII) طراحی شد که این آنزیم ردیف نوکلئوتیدی CGCG را شناسایی می کند. آنزیم MvnI (FunDII) قادر است محصول تکثیری ژن ۱۶S rRNA *آناپلاسما اوویس* را برش دهد ولی بر محصول تکثیری *آناپلاسما مارجیناله* بی تاثیر است (تصویر شماره ۱-B).

یافته های این مقاله نشان می دهد که آزمون RFLP طراحی شده بر اساس ژن ۱۶S rRNA بر خلاف آزمون RLB می تواند *آناپلاسما اوویس* را از *آناپلاسما مارجیناله* تفریق کند و آنالیز ژن ۱۶S rRNA نه تنها برای تشخیص جنس آناپلاسما بلکه برای تشخیص گونه های *آناپلاسما* نیز مفید است. در اکثر نقاط ایران این دو گونه آندمیک می باشند و روش PCR بر اساس ژن ۱۶S rRNA و متعاقب آن PCR-RFLP قادر است *آناپلاسما اوویس* را تشخیص و از *آناپلاسما مارجیناله* تفریق نماید. این روش، روش مناسبی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی و اقدامات کنترلی است، علاوه براین از این روش می توان در آینده جهت تشخیص این عوامل در حیوانات حامل و کنه های ناقل استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از پرسنل واحد پژوهشی انتقال سیستمهای بیولوژیکی ایران، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر وقدردانی می شود.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 1 (2009) 27-37

Detection of *Anaplasma ovis* based on 16S rRNA gene by PCR-RFLP in sheep from central part of Iran

Noaman, V [1,*], Shayan, P [2,3], Shahmoradi, A.H.[1]

Received: 17.08.2009; Accepted: 15.11.2009

Abstract:

One of the most specific methods for the differential diagnosis of *Anaplasma spp*. is the method of polymerase chain reaction. PCR-based methods on the 16S rRNA gene can differentiate the species in genus *Anaplasma* but the sequence of 16S rRNA in *A. ovis* is most similar to that of *A. marginale* (99.2%-99.9%) and designing of species-specific primers is impossible.
Sheep are affected by both *A. ovis* and *A. marginale*, so the aim of the present study was to develop and apply species-specific PCR-

1-Veterinary department of Isfahan research center for Agriculture and Natural resources, Isfahan, Iran
2-Center for Ticks and Tick-borne Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3-Investigating Group Molecular Biological System Transfer, Tehran, Iran
*Corresponding author: vnoaman@gmail.com

RFLP test based on 16S rRNA gene in sheep and goats.
Blood samples and corresponding blood smears of 150 sheep without any signs of diseases were prepared from a region with the previous history of anaplasmosis in Isfahan, Iran.
The blood smears were first analyzed by Giemsa staining and DNA extraction was performed only on positive blood samples with *Anaplasma spp*. in marginal point of erythrocytes in their blood smears.
The extracted DNA from blood cells were analyzed by *A. ovis* and *A. marginale* specific semi-nested PCR and PCR-RFLP using primers derived from 16S rRNA gene and restriction endonuclease MvnI (FunD II).
The restriction endonuclease MvnI (FunD II) recognizes the sequence (CGCG) in corresponding PCR product of A. ovis and cut it in the position 70, whereas the used restriction enzyme leave un-cut the corresponding PCR product of *A. marginale* (TACG). This simple PCR method based on 16S rRNA gene flowing by RFLP give a rapid discrimination between *A. ovis* and *A. marginale*, which is useful for epidemiological survey and development of control strategies.

Keywords: *Anaplasma ovis*, Semi-nested PCR, PCR-RFLP, Sheep, Iran.

منابـع:

Bekker, C.P., de Vos, A., Taoufik, A., Sparagano, O.A., Jongejan, F. 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of Ehrlichia ruminantium in Amblyomma variegatum ticks by reverse line blot hybridisation. Veterinary Microbiology. 89, 223–238.

Bradway, D.S., Torioni de Echaide, S., Knowles, D.P., Hennager, S.G., McElwain, T.F. 2001. Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. Journal of Veterinary Diagnosis Investigation. 13(1), 79-81.

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. Veterinary Microbiology. 124, 107-114.

de la Fuente, J., Lew, A., Lutz, H., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Molad, T., Mangold, A., Almazan, C., Naranjo, V., Gortazar, C., Torina, A., Caracappa, S., Garcia-Perez, A., Barral, M., Oporoto, B., Ceci, L., Carelli, G., Blouin, E., Kocan, K.M. 2005. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Animal Health Reserch Review. 6, 75–89.

de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Hogg, J.T., Miller, D.S., Naranjo, V., Almazán, C., Anderson, N., Kocan, K.M. 2006. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strains from bighorn sheep in Montana. Journal of Wildlife Disease. 42(2), 381-385.

de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Naranjo, V., Fernández de Mera, I.G., Mangold, A.J., Keating, K.A., Kocan, K.M. 2007. Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma ovis strains. Veterinary Microbiology. 119(2-4), 375-81.

Dreher, U.M., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Regula, G., Cagienard, A.Y., Stark, K.D.C., Doherr, M.G., Filli, F., Hassig, M., Braun, U., Kocan, K.M., Lutz, H. 2005. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. Veterinary Microbiology. 107, 71-79.

Dumler, J., Barbet, A., Bekker, C., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F. 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

Evolution of Microbiology. 51, 2145–2165.

Eriks, I.S., Palmer, G.H., McGuire, T.C. 1989. Detection and quantitation of Anaplasma marginale in carrier cattle by using a nucleic acid probe. Journal of Clinical Microbiology. 27, 279–284.

Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F. 2000. Anaplasmosis control. Past, present, and future. Annals of the New York Academy of Science. 916, 501–509.

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. Clinical Microbiology Review. 16, 698–712.

Kuttler, K.L. 1984. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. Journal of wildlife Disease. 20, 12-20.

Lew, A.E., Gale, K.R., Minchin, C.M., Shkap, V., de Waal, D.T. 2003. Phylogenic analysis of the erythrocytic Anaplasma species based on 16SrDNA and GroEL(HSP60) sequences of A. marginale, A. centrale and A. ovis and the specific detection of A.centrale vaccine strain. Veterinary Microbiology. 92, 145-160.

Lew, A.E., Jorgensen, W.K. 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. African Journal of Biotechnology. 4 (4), 292-302.

Liu, Z., Luo, J., Bai, Q., Ma, M., Guan, G., Yin, H. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of Anaplasma species in China for phylogenetic analysis. Veterinary Microbiology. 107(1-2), 145-148.

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

Noamanm V,, Shayanm P,, Amininiam N. 2009. Molecular diagnostic of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. Iranian Journal of Parasitology. 4(1), 31-38.

Scoles, G.A., Goff, W.L., Lysy, T.J., Lewis, G.S., Knowles, D.P. 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. Veterinary Microbiology. 130, 184–190.

Torina, A. and Caracappa, S. 2007. Anaplasmosis in cattle .Italyian Journal of Veterinary Research Communication. 31(Suppl. 1), 73–78.