تواجد أضداد *Anaplasma marginalae* في الأبقار في محافظة ذي قار –جنوب العراق – باستخدام فحص الاليزا التنافسية

جليل عبد غاطي
المستشفى البيطري / ذي قار

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية لتأكيد تشخيص الانابلازما في مختلف الأعمار في الأبقار بالطرق المصلية اعتمادا على تواجد الأضداد الخاصة بالركتسيا *Anaplasma marginalae* .أظهرت نتائج الفحص بالاليزا التنافسية أن 68 عينة (73.9%) كانت موجبة للركتسيا*Anaplasma Marginalae* من أصل 92 عينة جمعت من الأبقار الواردة إلى المستشفى البيطري في الناصرية لغرض الفحص والعلاج خلال شهر مايس , حزيران وتموز2010 .بلغت نسبة الإصابة في الأبقار البالغة 73% بينما بلغت نسبة الإصابة في العجول بعمر 1–12 شهر 78% اظهر بعضها أعراض سريريه مميزة للإصابة بالطفيليات الدموية.

المقدمة

تعد *Anaplasma marginalae* احد الركتسيا الدموية الخطيرة التي تصيب الأبقار في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق الحارة في العالم.ينتقل الطفيلي حياتيا بوساطة القراد واليا بوساطة الحشرات الأخرى والأدوات(1,2).يهاجم الطفيلي كريات الدم الحمر ويسبب تحللها خارج الأوعية الدموية اذ تظهر الأبقار المصابة الضعف واليرقان ,فقر الدم والحرارة العالية بينما لا تظهر المجترات الأخرى و البرية علامات سريريه وتكون إصابتها كامنة وتبقى حاملة للطفيلي(3).يلاحظ الشكل الحاد من المرض عادة في الأبقار بعمر (2–3) سنوات وتتميز الأعراض السريرية بارتفاع درجة الحرارة (40–41 م) ،قلة الشهية،الكآبة،الانكاز،قلة إدرار الحليب،توقف الاجترار،ضعف حركة الكرش،سيلان اللعاب،إفرازات أنفية،شحوب الأغطية المخاطية،اصفرار الجلد،زيادة في النبض، وسرعة التنفس،إمساك وأحيانا قد يحدث الإسهال،ارتجاف العضلات،قلة الوزن،الضعف العام،يصبح الحيوان بعدها هزيلا ويستلقي على الأرض وينفق بعد (2–3) أيام وقد يشفى وتعود درجة حرارته إلى طبيعتها،ويلاحظ الكسل،العطش والإجهاض في الأبقار الحوامل بين الشهر3–8 من الحمل،أما في الذكور فلوحظ عقم وقتي.أما الشكل فوق الحاد فيلاحظ في الأبقار كبيرة السن ويتصف بظهور أعراض شديدة وبشكل مفاجئ ويحدث الموت خلال ساعات قليلة حيث تظهر على الحيوان أعراض ارتفاع درجة الحرارة،تدلي الأذنين كآبة شديدة،خشونة الجلد،توقف إدرار الحليب،سيلان اللعاب،شحوب الأغطية المخاطية،اليرقان،زيادة كبيرة في النبض، ضربات القلب وسرعة التنفس،وتصل نسبة الهلاكات في هذا الشكل من المرض إلى (60–80%) وقد تلاحظ أعراض عصبية قبل الموت بفترة قصيرة حيث يصبح الحيوان هائجا"وعدوانيا"وقد يصاب بتشنجات الأطراف والرقبة،كما يلاحظ الارتجاف والشلل أحيانا.يلاحظ الشكل المزمن من المرض عند انخفاض طفيلية الدم حيث يظهر اليرقان وفقر الدم بوضوح متمثلا"باصفرار الأغشية المخاطية, الهزال فقدان الشهية،كما لوحظ إمساك , ضعف حركة الكرش ولا اتساق حركي . يكون الشفاء عادة بطيئا وتطول فترة النقاهة التي قد تصل إلى ثلاث أشهر وتتصف بوجود الشهية المنحرفة ويصبح الحيوان حاملا للمرض لفترة غير محدودة ومستعدا للإصابة بالعديد من الممرضات الأخرى(4).

المواد وطرائق العمل

سحب 10مل دم وريدي من الأبقار عشوائيا من المناطق المحيطة بالمستشفى البيطري في الناصرية خلال شهر مايس , حزيران وتموز2010 , تركت العينات لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لتتجلط ثم وضعت في الثلاجة وعزلت في اليوم الثاني حيث تم حفظ المصول في درجة (– 18) في التجميد لحين استعمالها. خضعت 92عينة مصل الى فحص الاليزا التنافسية (شركة VMRD).

اختبار الاليزا التنافسية

مبدأ الاليزا التنافسية:

تعمل أضداد المصل المستخدم في الفحص على تثبيط الارتباط بين المقترن ومستضد الركتسيا الموجود في حفر البليت .ارتباط المقترن أو عدم ارتباطه يكشف عنه بإضافة المادة الأساسية(Substrate) التي تطور التفاعل الى لون. ان شدة اللون تعبر عن وجود أضداد كافية وبالتالي عدم وجود إصابة مرضية اما ضعف او عدم اللون فيعبر عن وجود أضداد كافية ومعبرة عن وجود إصابة مرضية.

طريقة الاختبار حسب إرشاد الشركة المنتجة:

1–هيأت العينات والبليتات و المصول المراد فحصها وذلك بإذابتها من الانجماد ووصولها حرارة الغرفة (21–25م) . وضعت المصول على جهاز الهزاز لمدة دقيقة واحدة من اجل مزجها جيدا.

2– وضع مقدار 70 ملي مايكرون من كل مصل وسيطرة في حفر البليت ذات الشكل u (Coated

adsorption\ plate B) ما عدا 4 حفر استخدمت للسيطرة حفرتان للموجب وثلاث حفر للسالب.حضنت البليت لمدة 30 دق بدرجة حرارة 21–25 م.ثم نقل 50 ملي مايكرون من العينات والسيطرة الموجبة والسالبة الى البليت (Plate A) المطلية بالمستضد (Anaplasma coated antigen plate) وحضنت لمدة ساعة بدرجة حرارة21–24 م.

3- غسلت البليت بمحلول الغسل المحضر مسبقا لمرتين.

4-وضع المقترن (Conjugate)في جميع حفر البليت وبمقدار 50 ملي مايكرون ووضعت البليت على الجهاز الهزاز لدقيقة . غطيت البليت برقائق الألمنيوم تحاشيا للتبخر ثم وضعت في الحاضنة لمدة 20 دق وبدرجة حرارة 21–25 م.

5- غسلت البليت بمحلول الغسل المحضر مسبقا 4 مرات.

7-أضيفت مادة (Substrate)الى جميع الحفر وبمقدار50 ملي مايكرون في جو مظلم ثم وضعت البليت في مكان معتم لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة (21–25م)

8- بعد مضي عشرين دقيقة ,أضيفت كمية 50 ملي مايكرون من محلول stop solution الى كل الحفر.

9-قرأت النتائج مباشرة ,وذلك بإدخال البليت في جهاز قارئ الاليزا(ELISA Reader)المضبوط على موجة قدرها 650 نانومتر.

النتائج

أظهرت نتائج الفحص بالاليزا ان 68 عينة (73.9%) كانت موجبة لجرثومة Marginalae . A من أصل 92 عينة .

بلغت نسبة الإصابة في الأبقار البالغة 73% بينما بلغت نسبة الإصابة في العجول بعمر 1–12 شهر 78% كما موضح في الجدول رقم (1).

نتائج الفحص بالاليزا	العجول 1–12 شهر	%	الأبقار البالغة	نسبة الإصابة	المجموع	%
العينات الموجبة	11	%78.5	57	%73	68	%73.9
العينات السالبة	3	%21,5	21	%27	24	%26
المجموع	14	%100	78	%100	92	%100

جدول رقم(1) يوضح عدد العينات في الأبقار والعجول و نسبة الإصابة

المناقشة

هدفت الدراسة الحالية لتأكيد تشخيص الركتسيا *A. marginalae* في الأبقار وبيان نسبة الإصابة وخاصة في فصل الصيف لتداخل المرض مع أمراض طفيليات الدم التي تزداد انتشارا في هذا الفصل (مثل الثايليريا والبابيزيا) مقارنة مع انتشار القراد و الذي يعد الناقل الرئيسي للممرض إضافة إلى زيادة حركة الحشرات العاضة الأخرى ونظرا لصعوبة تشخيص المرض مختبريا بوساطة الشرائح المصبوغة خاصة في بداية الإصابة أو في الحالات (الكامنة) الحاملة للركتسيا حيث يكون عددها قليل جدا في كريات الدم الحمراء.إن عدم القدرة على تشخيص الحالة وهي في الطور الحاد الذي يتشابه مع أمراض طفيلية الدم الأخرى كما في البابيزيا يجعلها تتحول الى المرحلة الكامنة التي تتسبب في نشر المرض بدون أعراض سريريه مهمة على الرغم من أنها تظهر موجبة للفحوص المصلية (8).جاءت هذه الدراسة مكملة لدراسة مهمة سابقة أجريت في العراق تناولت الإصابات الطفيلية الدموية المختلطة في الأبقار (4) و اعتمدت على المسحات الدموية فقط لتشخيص المرض ومسحه مما أدى إلى تكوين صورة عن المرض أهملت فيها الحالات الكامنة او التي في طور النقاهة . لقد أظهرت النتائج الحالية انتشارا واسعا للمرض في مختلف الأعمار في الأبقار حيث يمكن هنا الكشف عن الحيوانات المصابة دون الاعتماد على وجود الممرض (الركتسيا) .ضاهت نتائج دراستنا ما جاء في دراسة (5) حيث كانت نسبة الإصابة في الأبقار 58.74% في البرازيل ونسبة إصابة بلغت 55.35% في الأبقار عموما ووصلت النسبة الى 82% في الأبقار البالغة أكثر من أربع سنوات (6) في تركيا ، كما بلغت نسبة الإصابة في البرازيل أيضا في مقاطعة (Londrina) 92.94% في الأبقار البالغة. وكانت نسبة الإصابة في العجول 81.2% (7). بينما تدنت الإصابة الى 37.8% في الأبقار في السودان (مقاطعة اكواتوريا). أظهرت الدراسات المصلية في مختلف أنحاء العالم وجود أضداد الجرثومة وانتشارها بشكل واسع خاصة في الدول التي لا تتبع برامج للسيطرة المكثفة على القراد والدول التي لا تستخدم اللقاحات الخاصة بالانابلازما

(9).بينت دراستنا انتشارا كبيرا للمرض في أبقار وعجول تعاني من علامات تشير إلى الإصابة بالطفيليات الدموية ومنها الانابلازما وقد تكون مصابة فعلا وقد تم تشخيص الركتسيا *A. marginalae* في العجول الرضيعة (4) كما تواجدت الأضداد في أبقار لم تظهر علامات سريريه مهمة إشارة إلى إنها في طور النقاهة أو في مرحلة كمون الإصابة (حاملة للممرض) أما العجول فقد تكون حاملة للأضداد عن طريق اللبا أو أصيبت كما في الأبقار البالغة. إن انتشار القراد دون سيطرة يؤدي إلى استمرارية توطن المرض في العراق كما إن غياب اللقاحات ضد أمراض الطفيليات الدموية عموما ومنها الانابلازما يجعل عملية تشخيص المرض بأسهل الطرق وأسرعها مهما لتكون عملية العلاج مبكرة وفعالة لحماية الأبقار المصابة خاصة التي تعاني من حالة إجهاد نتيجة الولادة أو نقص التغذية أو من الإصابات المختلطة ولحماية العجول الصغيرة حيث تكون حساسة للمرض وترتفع فيها نسبة الهلاكات بسبب هذا المرض .

المصادر

1. Esthers. Trueblood, Travis C. Mcguire, and Guyh. Palmer (1991). Detection of Anaplasma marginale Rickettsemia Prior to Onset of Clinical Signs by Using an Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Clinical Microbiology,Pp. 1542-1544.
2. Luciana Gatto Brito, Márcia Cristina de Sena Oliveira, Rodrigo Barros Rocha, Francelino Goulart da Silva Netto, Adriana Denise Marim ,Gislaine Cristina Rodrigues de Souza, Fabiano Benitez Vendrame, and Maria Manuela da Fonseca Moura (2010). Anaplasma marginale infection in cattle from south-western Amazonia. Pesq. Vet. Bras. 30(3):Pp249-254.
3. U. M. Dreher, J. de la Fuente, R. Hofmann-Lehmann, M. L. Meli, N. Pusterla, K. M. Kocan, Z. Woldehiwet, U. Braun, G. Regula, K. D. C. Staerk, and H. Lutz (2005).Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* Clin Diagn lab lmmunoal. 12(10): Pp1177-1183.
4. حسين علي سعود (1997).دراسة وبائية وتشخيصية لبعض الأمراض المختلطة في المجترات اطروحة دكتوراه مقدمة الى جامعة بغداد – كلية الطب البيطري
5. Marana ER, Dias JA, Freire RL, Vicentini JC, Vidotto MC, Vidotto O.(2009).Seroprevalence of Anaplasma marginale in cattle from Center-South Region of Paraná State, Brazil by a competitive ELISA test with recombinant MSP5-PR1 protein]. Rev Bras Parasitol Vet. 18(1):Pp20-6.
6. Fatihm. Birdane, Ferda Sevinc and Ozlem Derinbay.(2006). Anaplasma Marginale Infectionsindairy Cattle: Clinical Disease Withhigh Seroprevalence. Bull Vet Inst Pulawy 50, Pp467-470.
7. Gisele Maria de Andrade , Odilon Vidotto, Marilda Carlos Vidotto , Eidi Yoshihara ; Flora S. Kano and Carlos Henrique S. Amaral. (2001).Seroprevalence fo Anaplasma marginale in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. Semina: Ci. Agrárias, Londrina, v. 22, n.2, Pp. 155-159, jul./dez
8. Salih, D. A., Hassan, S. M., Julla, I. I., Kyule, M. N., Zessin, K.-H. and El Hussein, A. M. (2008). Distribution and Application of ELISA for the Seroprevalence of Tick-Borne Diseases in Central Equatoria State, Sudan. Transboundary and Emerging Volume 55, Issue 5-6,P p 257–262Diseases.
9. R.V.Ndou,T.P.Diphahe, B.M.Dzoma, and L.E.Motsei.(2009). The Seroprevalence and Endemic Stability of Anaplasmosis in cattle around Mafikeng in the north west province , south Africa. Veterinary Research 3 (1): 1-3 ,Pp1993-5412.

Seroprevalence of *Anaplasma marginalae* among cows in Nasiriya city- South of Iraq- by competitive Elisa.

J.A. Gati
Vet.hospital-Dhi-qar province.

Abstract

The present study aimed to confirm a diagnosis of anaplasmosis at different ages in cattle by serological methods based on antibodies specific to *Anaplasma marginalae* The results showed that 68 samples (73.9%) were positive for Rickettsia *Anaplasma. marginalae* out of 92 samples collected from cows contained to the veterinary hospital in Nasiriyah for the purpose of inspection and treatment during the month of May, June and July 2010 The percentage of infection in adult cattle was 73% while the percentage of infection in calves aged 1-12 months was 78% , in calves and cows showed some clinical symptoms indicate infection with blood parasites and others did not show it.