شناسائی مولکولی *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان به روش PCR

وحید نعمان [۱]، نصرالله واحدی نوری *[۱]، عبدالرضا نبی‌نژاد [۲]، هادی میران زاده [۳]، مسعود برومند جزی[۳]

چکیده

آناپلاسما اوویس، عامل بیماری در گوسفند و بز، در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است. هدف از این مطالعه تعیین گونه *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان و تاثیر برخی از متغیرها (فصل، سن و جنس دام) در میزان شیوع آن بود. برای این منظور، تعداد ۲۰۰ نمونه خون از طریق رگ وداج گوسفندان بطور تصادفی از نقاط مختلف استان گیلان اخذ گردید. DNA استخراجی از نمونه های خونی با جفت آغازگری که قطعه ۱٤٦۸ جفت بازی از ژن *16S rRNA* جنس آناپلاسما را تکثیر می کرد، تکثیر شد. سپس نمونه های مثبت با جفت آغاز گر اختصاصی *آناپلاسما اوویس* از ژن *msp4* که قطعه ۸٦٦ جفت بازی را تکثیر می کرد، تکثیر شد. در مجموع، ۳۸ نمونه از۲۰۰ نمونه (۱۹درصد) ازنظر *آناپلاسما اوویس* مثبت بودند. در مقایسه فراوانی آناپلاسما اوویس در فصول مختلف، آلودگی در شش ماه دوم سال با اختلاف معنی داری بیشتر از شش ماه اول سال بود (P< ۰/۰۵). اما در ارتباط با سنین مختلف دام های مورد بررسی و جنس دام هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (P> ۰/۰۵). در این مطالعه آلودگی به *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان تایید شد. مطالعه در خصوص روشهای انتقال *آناپلاسما اوویس* و ناقلین آن در ایران تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است و مستلزم تحقیقات بیشتری در مطالعات آینده می باشد.

واژگان کلیدی: شناسائی مولکولی، آناپلاسما اوویس ، گوسفندان ، گیلان، PCR

تاریخ دریافت:: ۱٤۰۱/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۱/۱

مقدمه

جنس آناپلاسما از راسته ریکتزیاله و خانواده آناپلاسماتسه آ، شامل گونه های از باکتریهای گرم منفی، درون سلولی اجباری است که می‌توانند بر سلامت انسان و حیوان تأثیر بگذارند(۱).

امروزه جنس آناپلاسما شامل گونه‌های *آناپلاسما پلاتیس*، *آناپلاسما بوویس*، *آناپلاسما مارجیناله*، *آناپلاسما اوویس*، *آناپلاسما سنتراله* و *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* است. این باکتری های منتقله از بندپایان همگی سلول های خونی میزبان های یوکاریوتی را آلوده می کنند و منحصراً در واکوئول های داخل سیتوپلاسمی سلول مستقر می شوند. گونه های مختلف، جایگاه سلولی و میزبانی متفاوتی دارند، بطوریکه *آناپلاسما اوویس*، *آناپلاسما مارجیناله* و *آناپلاسما سنتراله*، گلبول های قرمز نشخوارکنندگان را آلوده می نمایند(۲). بیماری های شاخص ناشی از گونه های آناپلاسما در نشخوارکنندگان اهلی کوچک شامل: تب منتقله از کنه، ناشی از *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* و *آناپلاسموزیس* گوسفندی ناشی از *آناپلاسما اوویس* است. *آناپلاسما اوویس*، عامل ایجاد کننده بیماری در گوسفند و بز، برای اولین بار در سال ۱۹۱۲ توصیف شد و از آن زمان در بسیاری از قاره ها در سراسر جهان گزارش شده است. این باکتری به عنوان یک عامل بومی، در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است، اما میزان خسارات اقتصادی آن هنوز به خوبی مطالعه نشده است. این باکتری عمدتاً باعث بیماری تحت بالینی با تأثیر ظاهری کم در حیوانات شده و به عنوان یک عامل بیماریزا با اهمیت جزئی در نظر گرفته می‌شود. اگرچه علایم عفونت با *آناپلاسما اوویس در بز و گوسفند* اغلب تحت بالینی یا

*۱- بخش تحقیقات بیماریهای انگلی دامی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران nsvahedi@yahoo.com

۲- بخش تحقیقات بیماریهای ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.

خفیف مشاهده می شود، اما در شرایطی مانند: عفونت های همزمان، سوء تغذیه، آبستنی یا سایر عوامل استرس زا، مانند هوای گرم، واکسیناسیون، کرم زدایی، آلودگی شدید دام با کنه و حمل و نقل طولانی، علایم بیماری بروز می کند. بسته به تعداد باکتری آلوده کننده، دوره کمون بیماری ممکن است بین ۵ تا ٤٠ روز متغیر باشد(۳). در اوج باکتریمی، ۱ تا ۱۲ درصد از گلبول های قرمز در بزها و ۰/۱ تا ٤ درصد گلبول های قرمز در گوسفندان آلوده می شوند. در حیواناتی که طحال آنها برداشته شده، ۹۰ درصد از گلبول های قرمز می توانند در اوج باکتریمی آلوده شوند. بیشترین سطح کم خونی چند روز پس از اوج باکتریمی رخ می دهد و این زمانی است که علائم بالینی حیوان آلوده بیشتر نمایان می شود. علائم بالینی مشاهده شده در مرحله حاد عفونت *آناپلاسما اوویس* عبارتند از: تب (بالا با نوسان ثابت)، رنگ پریدگی غشاهای مخاطی، افزایش ضربان قلب و تنفس، افسردگی، سقط جنین و کاهش قابل توجه وزن بدن که ممکن است با کاهش حرکت شکمبه و یبوست همراه باشد. در انتقال *آناپلاسما اوویس* به نشخوارکنندگان، انواع مختلف جنس های کنه خانواده ایسکودیده نقش دارند. آناپلاسموزیس ناشی از *آناپلاسما اوویس* در ایران، بیش از ۸۵ سال است که شناخته شده است. مطالعات انجام گرفته تاکنون نشان می دهد که میزان عفونت *آناپلاسما اوویس* در بین گوسفندان مناطق مختلف کشور، از ۵ تا ۸۷ درصد، متغییر می باشد(٤-۸). مطالعات صورت گرفته در کشورهای همسایه ایران از جمله در مناطق مختلف پاکستان، میزان آلودگی گوسفندان به *آناپلاسما اوویس را* ۲۱ درصد تا ۳۱ درصد نشان می دهد(۹, ۱۰). در کشورهای همسایه غربی ایران نظیر عراق، میزان آلودگی گوسفندان به *آناپلاسما اوویس* ٦٦/۷ درصد و در ترکیه نیز ٦۰ درصد و ٦۷/۰٦ درصد گزارش شده است(۱۱). همچنین گونه های مختلف کنه شامل جنس های *درماسنتور، ریپی سفالوس، ایکسودس و هیالوما* به عنوان کنه های ناقل این باکتری در ایران شناخته شدند(۱۲, ۱۳).

با توجه به اینکه، اطلاعات در زمینه شیوع *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان و جنبه های اپیدمیولوژی آن ناشناخته می باشد، لذا این تحقیق برای اولین بار با هدف تعیین میزان شیوع مولکولی *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان و تاثیر برخی از متغیرها از قبیل: فصل، سن، و جنس دام بر میزان شیوع آن صورت گرفته است.

مواد و روش‌کار

نمونه برداری: این تحقیق بصورت مقطعی- توصیفی بر روی گوسفندان استان گیلان انجام گردید. برای این منظور در طول سال۱۳۹۷، به‌صورت تصادفی از ۲۰۰ رأس گوسفند به‌ظاهر سالم از نقاط مختلف استان (آستانه اشرفیه، رشت، رودبار، رودسر، شفت، صومعه‌سرا، طوالش، فومن، لاهیجان و لنگرود) نمونه‌گیری خون به‌عمل‌آمده است. از هر دام ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شد. اطلاعات مربوط به دامداری و دام‌های مورد نمونه‌گیری بر اساس گفته دامدار در برگه های جداگانه ای ثبت شد. نمونه‌ها در یخ زن (منهای ۲۰درجه سلسیوس) جهت آزمایشهای بعدی نگهداری گردید. جهت شناسایی مولکولی *آناپلاسما اوویس* در گوسفند, مراحل ذیل انجام گردید.

استخراج DNA

برای این منظور، نمونه‌های خون را از یخزن خارج و در دمای اتاق قرار داده، پس از ذوب، تقریباً ۵۰ میکرو لیتر از هر نمونه را در داخل تیوب اپندورف ۱/۵ سانتی‌متر مکعب ریخته، سپس با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA تولیدشده در شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت، استخراج DNA انجام گرفت. سپس DNA استخراجی بر اساس دستورالعمل، بر روی ژل آگارز مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت (١٤).

PCR اولیه

PCR اولیه برای تشخیص جنس *آناپلاسما* بدون در نظر داشتن گونه خاصی انجام گرفت. بدین منظور از جفت آغازگر Anaplasma all استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن شامل تمامی گونه‌های *آناپلاسما* می شود. آغازگرهای بکار رفته به صورت زیر بوده است.

Forward strand primer: 5` AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3`

Reverse strand primer: 5'ACAGCTACCTTGTTACGACTT 3'

باند حاصله از تکثیر در اثر این جفت آغازگر پس از PCR در همه گونه‌ها در حدود ١٤٦٨ جفت بازخواهد بود. محصول تکثیرشده توسط این جفت آغازگر دربرگیرنده قطعه بسیار متغیر(Hyper Variable Region) V1 از ژن *16S rRNA* جنس *آناپلاسما* است. بعد از اتمامPCR ، نمونه‌ها در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول 0.5x TBE و با ولتاژ ۱۰۰ ولت آنالیز شدند. جهت ارزیابی باندهای به‌دست‌آمده مارکر (100bp plus DNA Ladder) ساخت شرکت Cinna Gen در ژل مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغییر V1 ژن *16S rRNA* در سه گونه *آناپلاسما اوویس*، *آناپلاسما*سنتراله و *آناپلاسمامارجیناله* دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای نمی‌باشند، لذا برای تشخیص گونه *آناپلاسما اوویس* از ژن *msp4* استفاده شد(١٤).

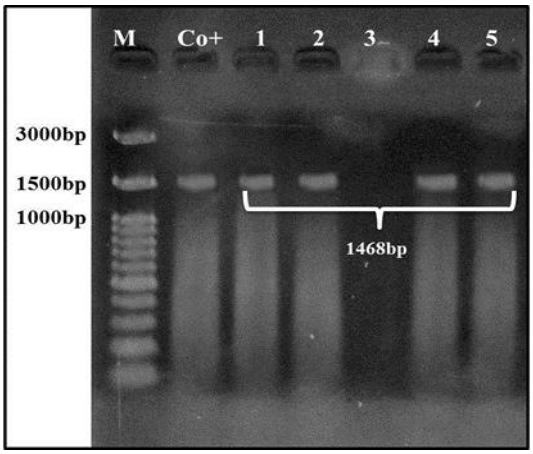
PCRجهت تکثیر گونه *آناپلاسما اوویس* با استفاده از ژن *msp4*

برای این منظور آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که بتواند فقط ژن *msp4* گونه *آناپلاسما اوویس* را در خون گوسفند تکثیر نماید. بنابراین از DNA استخراجی نمونه های مثبت و با استفاده از جفت آغاز گرهای اختصاصی و با آغازگرهای Anaplasma ovis sense (5'GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGT TTAC3´) و Anaplasma ovis Antisense (5'CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC3´) اختصاصی آزمایش تعیین گونه بر روی DNA نمونه های مثبت PCR اولیه انجام شد. در صورتیکه نمونه با هر جفت از آغازگرهای اختصاصی *آناپلاسما اوویس* تکثیر می شد باندی در حدودbp ٨٦٦ روی ژل مشاهده می گردید. در پایان پس از به دست آمدن نتایج، از نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P< ۰/۰۵)، جهت مقایسه درصد فراوانی آلودگی گونه *آناپلاسما اوویس* و همچنین مقایسه درصد آلودگی آن در فصول مختلف سال، سنین مختلف وجنس دام استفاده شد.

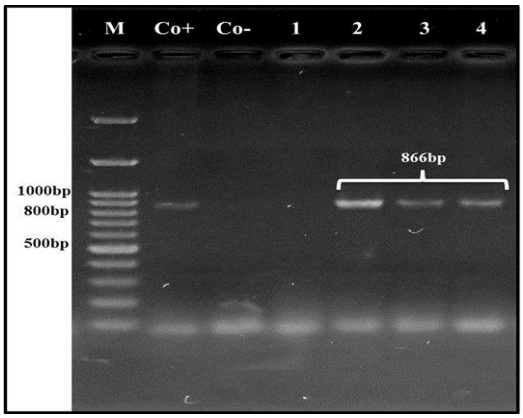
نتایج

نتایج آزمونهای فوق نشان داد، تعداد ۳۸ نمونه(۱۹ درصد) از ۲۰۰ نمونه گوسفندی مورد بررسی در PCR اولیه با استفاده از ژن *16S rRNA* از نظر آلودگی با جنس آناپلاسما مثبت بودند(نگاره ۱)(جدول ۱). در تعیین گونه *آناپلاسمااوویس* ، DNA استخراجی نمونه های مثبت، توسط جفت آغازگر اختصاصی Anaplasma ovis

sense و Anaplasma ovis Antisense برگرفته از ژن *msp4* تکثیر شدند که در۳۸ نمونه(۱۹ درصد) از ۲۰۰ نمونه، محصول مورد نظر bp ۸٦٦ مشاهده شد(نگاره۲) (جدول ۱).



نگاره ۱- تکثیر DNA با جفت آغازگر Anaplasma al l از ژن ۱٦S r RNA با محصول ۱٤٦۸ جفت باز. ۱،۲،٤و ۵ نمونه‌های مثبت تکثیر شده، +Co:کنترل مثبت آناپلاسما،M: مارکر ۱۰۰bp



نگاره ۲- تکثیر DNA با جفت آغازگر اختصاصی *Anaplasma ovi s* از ژن msp٤ با محصول ۸٦٦ جفت باز. ۲،۳و ٤ نمونه‌های مثبت تکثیر شده، +Co:کنترل مثبت، -Co:کنترل منفی، M: مارکر ۱۰۰bp

آلودگی *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان بر اساس متغیرهای مورد مطالعه

بر اساس نتایج بدست آمده ، درصد آلودگی *آناپلاسما اوویس* در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار و تابستان (۱۳ درصد)، پائیز و زمستان (۲٤/۱ درصد) می باشد(جدول۲). در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان در فصول مختلف نمونه گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی دار مشاهده گردید (P< ۰/۰۵).

جدول ۱-: نتایج کلی حاصله از آزمونهای ملکولی نمونه های خونی گوسفند

نوع دام	گونه های *آناپلاسما*	تعداد مورد بررسی	فراوانی آلودگی	درصد	حدود اطمینان ۹۵ درصد	
					کمترین	بیشترین
	آناپلاسما	۲۰۰	۳۸	۱۹	۲۶/۴	۴۴/۸
گوسفند	*آناپلاسما اوویس*	۲۰۰	۳۸	۱۹	۱۲/۵	۲۷/۸

همچنین درصد آلودگی *آناپلاسما اوویس* در بین گوسفندان و در سنین مختلف به ترتیب ،۱ – ۳سال (۰ درصد)، ۳ – ۵ سال (۱۹/۲ درصد) می باشد(جدول۲). در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان در سنین مختلف نمونه گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی دار مشاهده نگردید(P> ۰/۰۵).

درصد آلودگی *آناپلاسما اوویس* در بین گوسفندان و در جنس های مختلف به ترتیب ،در نر (۰ درصد)، و جنس ماده (۲۱/۱درصد) می باشد(جدول۲). در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان استان گیلان در جنس های مختلف نمونه گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی دار مشاهده نگردید(P> ۰/۰۵).

جدول ۲-: رابطه آلودگی گوسفندان گیلان به *آناپلاسما اوویس* و متغیرهای مورد بررسی

متغیر		*آناپلاسما اوویس* (منفی)		*آناپلاسما اوویس* (مثبت)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	P-Val ue
		درصد	فراوانی	درصد	فراوانی			
فصل	بهار و تابستان	۸۷	۸۰	۱۳	۱۲			
	پائیز و زمستان	۸۵/۹	۸۲	۲٤/۱	۲٦	۳/۹۲۸	۱	۰/۰٤۷
سن	۱-۳ سال	۱۰۰	۱۲	۰	۰			
	۳-۵ سال	۷۹/۸	۱۵۰	۱۹/۲	۳۸	۲/۹۹٤	۱	۰/۰۸٤
جنس	نر	۱۰۰	۲	۰	۰	۰/٤۷٤	۱	۰/٤۹۱
	ماده	۸۰/۸	۱٦۰	۲۱/۱	۳۸			

بحث

بیماری های منتقله از طریق کنه ها از جمله آناپلاسموزیس، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا به دلیل هزینه های مرتبط با بیماری، درمان و کاهش بهره وری در دام از اهمیت اقتصادی برخوردار هستند. در ایران و همچنین استان گیلان، اطلاعات محدودی در ارتباط با آلودگی گوسفندان به *آناپلاسما اوویس* وجود دارد. همانطور که نتایج این تحقیق نشان می دهد، از مجموع ۲۰۰ راس گوسفند مورد بررسی ،۳۸ راس (۱۹درصد)، از نظر آلودگی با گونه *آناپلاسما اوویس* مثبت بودند. اگرچه این میزان قابل توجه است، ولی در مقایسه با نتایج استانهای مازندران (۵۸/۹٪)، خوزستان (۸۷٪) و سیستان و بلوچستان (۸۰٪)، نسبتاً پائین می باشد(۱۵ ،۸ ،۶), از آنجائیکه در انتقال این باکتری، بند پایانی نظیر کنه و عوامل مکانیکی نقش دارند ، لذا آگاهی دامداران و مبارزه گسترده بر علیه بند پایان می تواند عاملی موثر در کنترل بند پایان و بیماریهای منتقله توسط آنها از جمله *آناپلاسما اوویس* باشد. براساس نتایج بدست آمده، درصد آلودگی به *آناپلاسما اوویس* گوسفندان در شش ماه دوم سال (پائیز/ زمستان) بیشتر از شش ماه اول سال(بهار/ تابستان) می باشد. معمولاً میزان آلودگی *آناپلاسما اوویس* با فصل فعالیت کنه ها افزایش می یابد. نتایج تحقیقات در استان مازندران نیز مشابه این تحقیق نشان داد که میزان آلودگی گوسفندان به *آناپلاسما اوویس* در شش ماه دوم سال بصورت معنی داری بیشتر از شش ماه اول سال بوده است و این تفاوت را به افزایش فعالیت کنه *ایکسودس رسینوس* (بعنوان ناقل *آناپلاسما اوویس*) در فصل زمستان نسبت داده اند (۸). همچنین تحقیقی در الجزایر نیز نشان داد که آلودگی در فصل پائیز بیشتر از فصول بهار و تابستان بوده است که با مطالعه اخیر همخوانی دارد. استرس تغییرات دمایی، کمبود علوفه و تغییرات فیزیولوژیک (آبستنی و شیردهی) دام نیز در این فصل در سرکوب ایمنی و افزایش آلودگی می توانند موثر باشند (۱٦). در کشورهای حوزه مدیترانه با توجه به فعالیت کنه ها در کل سال، آلودگی به

آناپلاسما معمولاً در تمامی فصول شایع می باشد. اگرچه باکتریهای جنس *آناپلاسما* به‌صورت بیولوژیکی توسط کنه ها منتقل می‌شوند، اما به‌طور مکانیکی از طریق نیش حشرات، سوزن ها و سایر ابزارها نیز منتقل می‌شوند. اکثر مطالعات انتقال آناپلاسما بر روی گونه های کنه متمرکز شده‌اند. همچنین تحقیقات نشان می دهد که کنه های جنس *درماسنتور* ناقل *آناپلاسما اوویس* در دنیای جدید هستند، در حالی که *ریپی سفالوس بورسا* و سایر کنه ها، ناقل در دنیای قدیم می باشند. از طرفی دیگر تحقیقات در گوسفندان نشان می دهد که شپش‌ها ممکن است به عنوان یک مخزن برای *آناپلاسما اوویس* عمل کنند. با توجه به فعالیت شپش ها در فصول سرد سال و نظر به اینکه کنه های جنس *ریپی‌سفالوس* و *درماسنتور* در گوسفندان استانهای شمالی کشور فعال می باشند(۱۷)، این نتایج می تواند قابل توجیه باشد. بهرحال به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

بر اساس نتایج این تحقیق، درصد آلودگی به *آناپلاسما اوویس* گوسفندان در سنین ۳-۵ سال بیشتر از سنین زیر ۳ سال می باشد (جدول ۲)، ولی این اختلاف به لحاظ آماری نیز معنی دار نمی باشد($P> ۰/۰۵$). معمولا" بز و گوسفند در تمام سنین مستعد ابتلاء به *آناپلاسما اوویس* هستند. از آنجائیکه دامهای بالغ، فصول فعالیت کنه ای بیشتری را نسبت به دامهای جوان، پشت سر می گذارند، لذا به همان نسبت بیشتر در معرض هجوم کنه ها قرار می گیرند. اگرچه سن فاکتور تاثیر گذار در میزان شیوع آلودگی آناپلاسما در بین دامها می باشد و با افزایش سن، درصد آلودگی نیز افزایش می یابد(۱۵, ۱٦, ۱۸)، در برخی تحقیقات قبل نیز هیچ تفاوتی سنی در حساسیت آلودگی به *آناپلاسما اوویس* برای بزها و گوسفندان نشان داده نشده است. نتایج این تحقیق نشان می دهد که درصد آلودگی در جنس ماده بیشتر از جنس نر می باشد(جدول ۲). در همین راستا نتایج تحقیقاتی در تونس نشان داد که میزان درصد آلودگی به *آناپلاسما اوویس*، در میش ها بطور قابل توجهی بیشتر از قوچ ها بوده است. لازم به توضیح است که دو سوم میش های مورد مطالعه، بیش از ٤ سال سن داشتند(۱۹). از طرف دیگر، نتایج تحقیقاتی در منطقه زابل نشان داد که میزان آلودگی در بزهای نر بیشتر از بزهای ماده بوده است(۱۵). به نظر می رسد، تفاوت در میزان آلودگی به گونه های آناپلاسما میان جنس نر و ماده، به چندین متغییر بستگی داشته و علاوه بر تاثیر سن به عواملی از قبیل: شرایط آب و هوائی، بهداشت دامداریها، نحوه نگهداری دامهای ماده آبستن ، گونه دام نشخوارکننده و غیره ... نیز باید توجه داشت(۲۰). بر اساس بررسیهای انجام شده مطالعه حاضر اولین تحقیق در خصوص *آناپلاسما اوویس در* گوسفندان استان گیلان است و حضور *آناپلاسما اوویس* را در تمامی مناطق نمونه گیری تایید می کند. روشهای انتقال *آناپلاسما اوویس* و ناقلین آن در کشور تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است و مستلزم تحقیقات بیشتر است. با توجه به اینکه هیچ یک از گوسفندهای آلوده علائم بالینی را در زمان نمونه گیری نشان ندادند، ارزیابی تأثیر اقتصادی عفونت *آناپلاسما اوویس* دشوار است. از آنجایی که تزریقات دارو و واکسن بدون تعویض سرسوزن در گله های گوسفند در ایران بسیار رایج است به نظر می رسد انتقال مکانیکی نیز در اپیدمیولوژی عفونت نقش داشته باشد. افزایش آگاهی دامدران از روشهای انتقال بیماریهای دامی از طریق کلاسهای ترویجی و رسانه های جمعی برای کنترل پایدار این بیماریها موثر خواهد بود.

فهرست منابع

1. Ybañez AP, Sivakumar T, Ybañez RHD, Vincoy MRB, Tingson JA, Perez ZO, et al. Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. Veterinary Parasitology. 2013;196(1-2):13-20.
2. Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of the genus Anaplasma–characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. Vet Med. 2008;53(11):573-84.
3. Yasini S, Khaki Z, Rahbari S, Kazemi B, Amoli JS, Gharabaghi A, et al. Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran. Iranian journal of parasitology. 2012;7(4):91.
4. Noaman V, Shayan P, Shahmoradi AH. Detection of Anaplasma ovis based on 16S rRNA gene by PCR-RFLP in sheep from central part of Iran. Journal of Veterinary Laboratory Research. 2009;1(1):27-37.
5. Noaman V, Bastani D, editors. Molecular study on infection rates of *Anaplasma ovis* and Anaplasma marginale in sheep and cattle in West-Azerbaijan province, Iran. Veterinary research forum; 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
6. Jalali S, Khaki Z, Kazemi B, Bandehpour M, Rahbari S, RaziJalali M, et al. Molecular detection and identification of *Anaplasma* species in sheep from Ahvaz, Iran. 2013.
7. Yousefi A, Rahbari S, Shayan P, Sadeghi-dehkordi Z, Bahonar A. Molecular detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* in sheep and goat in west highland pasture of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017;7(5):455-9.
8. Vahedi Noori N, Noaman V. Molecular Identification of *Anaplasma* pathogenic Species in Sheep in Mazandaran Province. Veterinary Researches & Biological Products. 2020;33(2):29-41.
9. Niaz S, Zia Ur Rahman IA, Cossío-Bayúgar R, Amaro-Estrada I, Alanazi AD, Khattak I, et al. Molecular prevalence, characterization and associated risk factors of *Anaplasma* spp. and *Theileria* spp. in small ruminants in Northern Pakistan. Parasite. 2021;28.
10. Ghaffar A, Ijaz M, Ali A, Farooqi SH, Rehman A, Ali MM, et al. First report on molecular characterization of anaplasmosis in small ruminants in Pakistan. Journal of Parasitology. 2020;106(3):360-8.
11. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Ekici S, et al. Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. Ticks and tick-borne diseases. 2017;8(2):246-52.
12. Noaman V. Identification of hard ticks collected from sheep naturally infected with *Anaplasma ovis* in Isfahan province, central Iran. Comparative Clinical Pathology. 2012;21(3):367-9.
13. Noaman V, Abdigoudarzi M, Nabinejad AR. Abundance, diversity and seasonal dynamics of hard ticks infesting cattle in Isfahan province, central Iran. Archives of Razi Institute. 2017;72(1):15-21.
14. Noaman V. Discrimination between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* by PCR-RFLP. World Appl Sci J. 2013;21(2):190-5.
15. Hakimi H, Sarani A, Takeda M, Kaneko O, Asada M. Epidemiology, risk factors, and co-infection of vector-borne pathogens in goats from Sistan and Baluchestan province, Iran. Plos one. 2019;14(6):e0218609.
16. Reghaissia N, Dahmane A, Boularias G, Ghalmi F, Azzag N. Epidemiological and Comparative Diagnostic Study of Spp. Infection in Goats from North-Eastern Algeria. Folia Veterinaria. 2020;64(3):61-74.
17. Vahedi Noori N, Abdi Goodarzi M, Kiasari MN. Evaluation of the species diversity and abundance of hard ticks (Family: Ixodidae) parasite of cattle and sheep in Mazandaran province. Veterinary Researches & Biological Products. 2015;28(1):58-64.

18. Said MB, Belkahia H, Alberti A, Zobba R, Bousrih M, Yahiaoui M, et al. Molecular survey of *Anaplasma* species in small ruminants reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Tunisia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2015;15(10):580-90.
19. Belkahia H, Said MB, El Hamdi S, Yahiaoui M, Gharbi M, Daaloul-Jedidi M, et al. First molecular identification and genetic characterization of Anaplasma ovis in sheep from Tunisia. Small Ruminant Research. 2014;121(2-3):404-10.
20. Riaz M, Nazir MM, Tasawar Z, Ahmed AN, Ayaz MM, Akram Q, et al. Molecular epidemiology and prevalence of *Theileria lestoquardi* and *Theileria ovis* infection in goats infested with tick vectors from Multan, Pakistan. Journal of Medical Entomology. 2019;56(3):844-8.