Veterinary Clinical Pathology, Vol.14, No. 55, Autumn 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2020.1904886.1274**

Molecular identification of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and sheep of Gilan province

Vahedi Nouri, N.[1]*, Noaman, V.[2], Rahim Abadi, E .[3]

1- Assistant Professor, Parasitic Diseases Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- Associate Professor, Parasitic Diseases Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3- Instructor, Parasitic Diseases Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
*Corresponding author's email: nsvahedi@yahoo.com
(Received: 2020/7/28 Accepted: 2020/12/16)

Abstract

Anaplasma phagocytophilum is one of the emerging pathogenic bacteria transmitted by mites, which causes zoonotic disease, between humans and many animals. Hence, its importance in public health is significant. The aim of this study was molecular identification of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and sheep of Gilan province. For this purpose, during 2018, 200 blood samples of cattle, and 200 blood samples from sheep were collected randomly via the jugular vein from different parts of Gilan province. The extracted DNA from blood cells were amplified by Anaplasma-all primers, which amplify an approximately 1468bp DNA fragment from region of 16S rRNA gene from various members of the genus Anaplasma. All 70 bovine positive specimens were analyzed for the presence of *A. phagocytophilum* with proprietary nested-PCR and 66 of blood samples (33%) were positive for *A. phagocytophilum.* In addition, 38 sheep positive samples with proprietary nested-PCR were analysed for the presence of *A. phagocytophilum* and 10 of sheep blood samples (5%) were positive for *A. phagocytophilum.* The chi-square test was used to compare the percentage of *A. phagocytophilum* contamination of cattle and sheep in association with different seasons, different ages, animal gender, sea level, carriers and type of animal husbandry (semi-industrial-traditional). The results of this comparison indicated that only the abundance of *A. phagocytophilum* in sheep of Gilan province had a significant difference between the first and second half of the year ($p<0.05$). The results of this study showed that *A. phagocytophilum* is a common species of Anaplasma in livestock of Gilan province. Given the role of this species in the occurrence of granulocytic anaplasmosis in humans, this issue is important in terms of public health.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, Molecular identification, Cattel, Sheep, Gilan.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2020.1904886.1274

شناسایی مولکولی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (*Anaplasma phagocytophilum*) در گاوها و گوسفندان استان گیلان

نصرالله واحدی نوری[1*]، وحید نعمان[2]، ابراهیم رحیم آبادی[3]

۱- استادیار بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲- دانشیار بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- مربی بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: nsvahedi@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۹/۵/۷ پذیرش نهایی: ۹۹/۹/۲۶)

چکیده

گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* یکی از باکتری‌های بیماری‌زای نوپدید منتقله توسط کنه‌ها می‌باشد که باعث ایجاد بیماری مشترک بین انسان و بسیاری از حیوانات می‌گردد و به همین دلیل اهمیت آن در بهداشت عمومی جامعه قابل‌توجه می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی مولکولی گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوها و گوسفندان استان گیلان بود. بدین منظور در طول سال ۱۳۹۷، تعداد ۲۰۰ نمونه خون از طریق رگ وداج گاوها و ۲۰۰ نمونه خون از طریق رگ وداج گوسفندان، به‌طور تصادفی از نقاط مختلف استان گیلان جمع‌آوری گردید. جهت آزمایش PCR (polymerase chain reaction)، در ابتدا DNA استخراجی از نمونه‌های خونی، با جفت آغازگری که قطعه ۱٤٦٨ جفت بازی از ژن 16SrRNA جنس آناپلاسما را تکثیر می‌کند، تکثیر داده‌شد. ۷۰ نمونه مثبت اولیه گاوی با استفاده از روش nested-PCR از نظر وجود گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بررسی شدند و در نتیجه ٦٦ نمونه (۳۳ درصد)، مثبت تشخیص داده شد. همچنین ۳۸ نمونه مثبت اولیه گوسفندی با استفاده از روش nested-PCR، ازنظر وجود گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بررسی شدند که ۱۰ نمونه (۵ درصد)، از این نظر مثبت تشخیص داده شدند. تحلیل مقایسه‌ای درصد فراوانی آلودگی به *آناپلاسماfاگوسیتوفیلوم* گاوها و گوسفندان مورد آزمایش، در ارتباط با فصول مختلف سال، سنین مختلف، جنسیت دام، ارتفاع از سطح دریا، ناقلین و نوع دامداری (نیمه‌صنعتی- سنتی) هم نشان داد که فقط فراوانی گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان استان گیلان، بین دو نیمه اول و دوم سال دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۵$). نتایج مطالعه نشان داد که *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* از گونه‌های رایج آناپلاسما در بین دام‌های استان گیلان می‌باشد. با توجه به نقش *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در بروز آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک در انسان، این موضوع به لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*، شناسایی مولکولی، گاو، گوسفند، گیلان.

مقدمه

جنس آناپلاسما (Anaplasma)، یکی از چهار جنس متعلق به خانواده آناپلاسماتاسهآ (Anaplasmatacea) می‌باشد که شامل باکتری‌های گرم منفی و داخل سلولی اجباری بوده که عموماً ۲۰ گونه کنه در انتقال بیولوژیکی و همچنین تعدادی از مگس‌ها و ابزارهای آلوده نظیر سرنگ‌ها، در انتقال مکانیکی آن‌ها نقش دارند (Noaman, 2017). تاکنون ٦ گونه در جنس آناپلاسما شناسایی شده‌است. گونه‌های مختلف جنس آناپلاسما، مسئول بیماری همولیتیک آناپلاسموزیس (Anaplasmosis)، در انسان و حیوانات هستند که یکی از گونه‌های مهم آن *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (*Anaplasma phagocytophilum*) می‌باشد و در گستره وسیعی از جغرافیای دنیا، شامل مناطق معتدل، نیمه گرمسیری و گرمسیری، در چرخه زندگی خود، بین کنه‌های سخت و مهره‌داران فعال بوده و طیف وسیعی از جانوران شامل حیوانات اهلی تا وحشی را درگیر کرده و سبب بیماری‌های آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک (granulocytic anaplasmosis) در انسان (ارلیشیوز گرانولوسیتیک انسانی)، آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک در سگ (ارلیشیوز گرانولوسیتیک سگ‌سانان)، آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک در اسب (ارلیشیوز گرانولوسیتیک اسب سانان) و همچنین تب ناشی از کنه در نشخوارکنندگان می‌گردد (Noaman .,2019). گونه مذکور، همان‌طور که از نام آن برمی‌آید، در ارتباط با سلول‌های فاگوسیتوزکننده بوده و در داخل گرانولوسیت‌ها، عمدتاً نوتروفیل‌های انسان و حیوانات، به‌صورت اجباری زندگی نموده و تکثیر می‌نماید (Kocan *et al*., 2003).

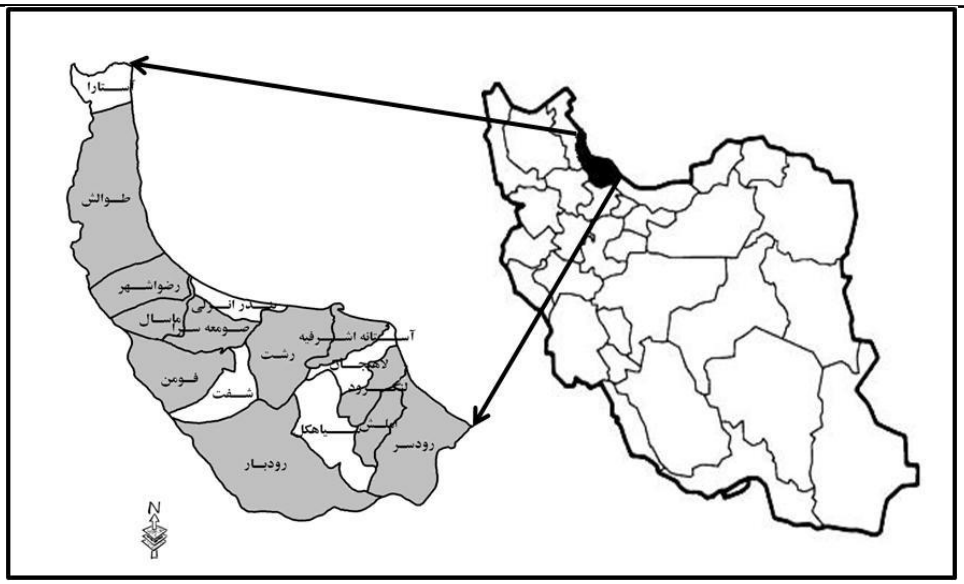
برای اولین بار در سال ۱۹۳۳، آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک انسانی، به‌عنوان یک تهدید جدی برای بهداشت عمومی جامعه در آمریکا و اروپا شناخته‌شده و اعلام گردیده که توزیع عفونت به عواملی از قبیل تراکم جمعیت کنه‌های ناقل و میزبان‌های مخزن بستگی دارد (Stuen *et al*.,2013). در نشخوارکنندگان، یک هفته پس از قرارگرفتن دام در معرض کنه‌های آلوده، بیماری آناپلاسموزیس گرانولوسیتیک با علائمی از قبیل تب شدید، لکوپنی، نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی و لنفوسیتوپنی نمایان می‌گردد (Gaowa *et al*., 2014). حیوانات جوان و به‌خصوص حیواناتی که از مناطق عاری از کنه به مناطقی با شیوع گسترده کنه مهاجرت می‌نمایند، مستعد بروز بیماری هستند. سقط‌جنین در میش‌ها و کاهش باروری در قوچ از علائم آلودگی می‌باشد (Grøva *et al*., 2011). همچنین کاهش تولید شیر و نرخ رشد در گاوها، مشاهده می‌شود. گزارش‌شده مرگ‌ومیر پائین می‌باشد، ولی در صورت عفونت ثانویه، میزان مرگ‌ومیر افزایش می‌یابد (Torina and Cariappa, 2007). در مطالعه مولکولی انجام‌شده توسط نعمان و مرادی در خصوص شناسایی آناپلاسما *فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای استان خوزستان عواملی از قبیل مناطق کوهستانی، سن دام، عرض جغرافیایی، میزان تولید شیر، میزان بهداشت دامداری و فاصله از گاوداری‌های دیگر، به عنوان مهم‌ترین فاکتورهای خطر مرتبط با شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای شیری استان خوزستان اعلام شده‌است (Noaman and Moradi, 2019). همچنین بیماری تب ناشی از کنه‌ها در گوسفندان یکی از بیماری‌های مهم و قابل‌توجه می‌باشد که سبب کاهش

معنی‌دار وزن، به‌خصوص در بره‌ها می‌گردد و معمولاً واریته‌های مختلف باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در بروز نوع علائم مربوطه نقش دارند (Stuen *et al.*, 2009). در واقع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* یک ارگانیسم بسیار ناهمگن با تنوع ژنتیکی زیاد می‌باشد که حدت-های متفاوتی در گونه‌های میزبان ایجاد می‌نماید. همچنین نمونه‌هایی که از برخی حیوانات مخزن جدا گردیده، ممکن است برای انسان بیماری‌زا نباشد (de la Fuente *et al.*, 2016). از سال ۲۰۰۹ تاکنون پژوهش‌های نسبتاً زیادی در خصوص شناسایی گونه‌های آناپلاسما در نقاط مختلف کشور صورت گرفته است (Razmi *et al.*, 2006; Ahmadi-Hamedani *et al.*, 2009; Jalali *et al.*, 2013; Hosseini -Vasoukolaei *et al.*, 2014; Noaman *et al.*, 2016; Yousefi *et al.*, 2017; Noaman, and Moradi, 2019). صالحی و همکاران نیز طی مطالعه‌ای بر روی گاوهای منطقه تالش در استان گیلان، گونه‌هائی از جنس آناپلاسما را به روش مولکولی شناسایی نموده‌اند (Salehi-Guilandeh *et al.*, 2018).

با توجه به اهمیت گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام و این‌که تاکنون مطالعه جامعی در خصوص این‌گونه باکتریایی، در نشخوارکنندگان (گاوها و گوسفندان) این استان صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر، برای اولین بار درسطح استان گیلان و به روش مولکولی، به منظور شناسایی باکتری مذکور انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تحقیق توصیفی حاضر، به‌صورت مقطعی روی تعدادی از گاوها و گوسفندان استان گیلان انجام گردید. برای این منظور در سال ۱۳۹۶، به‌صورت تصادفی از ۲۰۰ رأس گاو و ۲۰۰ رأس گوسفند به‌ظاهر سالم مربوط به نقاط مختلف استان (آستانه اشرفیه، رشت، رودبار، رودسر، شفت، صومعه‌سرا، طوالش، فومن، لاهیجان و لنگرود) نمونه خون تهیه شد (شکل ۱). نحوه کار در این مرحله به این صورت بود که از هر دام، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) (10 ml EDTA tube, Ava Co., Tehran, Iran) جمع‌آوری شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس جهت آزمایش‌های بعدی نگه‌داری می‌گردید. همچنین اطلاعات مربوط به دامداری و دام‌های مورد آزمایش، بر اساس گفته دامدار در برگه‌های جداگانه‌ای ثبت می‌شد.



شکل ۱- شهرهای مورد نمونه‌گیری در استان گیلان در سال ۱۳۹٦ (رنگ خاکستری)

در ادامه جهت شناسایی مولکولی آناپلاسما در نمونه‌های مذکور، مراحل زیر طی گردید:

- **استخراج DNA از نمونه‌های خون:** برای این منظور، نمونه‌های خون را از دمای ۲۰- درجه سلسیوس خارج و در دمای اتاق قرار داده، پس از ذوب، تقریباً ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (1.5 ml Eppendorf, Biologix Co., China) ریخته شد، سپس با استفاده از کیت تجاری مخصوص استخراج DNA از خون و بافت‌های انسان و حیوانات (MBST، ایران، کد K38/87، شماره ساخت ۲۷۰۷٤) و براساس توصیه شرکت سازنده، استخراج DNA به شرح ذیل انجام گرفت:

۱- ۱۸۰ میکرولیتر Lysis buffer به نمونه اضافه گردید.

۲- ۲۰ میکرولیتر Proteinase K به نمونه فوق افزوده و بعد از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انکوبه شد.

۳- ۳٦۰ میکرولیتر Binding buffer به محلول فوق افزوده، بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس انکوبه شد.

٤- ۲۷۰ میکرولیتر اتانول خالص (۱۰۰-۹٦ درجه) به محلول فوق افزوده و سپس ورتکس انجام گردید.

۵- یک ستون فیلتردار روی یک تیوب اپندورف استریل ۱/۵ میلی لیتری قرار داده و کل محلول مرحله ٤ به داخل آن منتقل شد. ستون همراه تیوب فوق در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس ستون روی یک تیوب جدید قرار داده شد و تیوب قبلی همراه مایع داخل آن دور ریخته شد (شکل ۲).

٦- ۵۰۰ میکرولیتر Wash buffer به داخل ستون ریخته، در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد همانند مرحله قبل تیوب مصرفی با یک تیوب جدید استریل تعویض شد.

۷- مرحله ٦ تکرار گردید.

۸- برای جداسازی باقی‌مانده الکل در ستون، ستون بدون افزودن هیچ محلولی، در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و تیوب زیر آن تعویض گردید.

۹- ۵۰ میکرولیتر از Elution buffer که از قبل در بن ماری ۷۰ درجه سلسیوس گرم شده بود، به ستون افزوده و بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق در دور۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۱۰- بدون تعویض تیوب مرحله قبل تکرار شد.

۱۱- ستونها دور ریخته شده و محلول داخل تیوب حاوی DNA استخراجی به حجم تقریبی ۱۰۰ میکرولیتر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

شکل ۲- ستون اختصاصی برای استخراج DNA

سپس DNA استخراجی بر اساس دستورالعمل و به شرح ذیل بر روی ژل آگارز مورد بررسی و تجزیه وتحلیل قرار گرفت . برای این منظور مواد مورد نیاز تهیه گردید.

- پودر آگارز شرکت Merk
- بافر 10X TBE که با فرمول "تریس بازی ۱۰۸ گرم، اسید بوریک ۵۵ گرم، EDTA ۰/۵ مولار با pH=8 ۴۰ میلی‌لیتر" تهیه و حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانیده شد. سپس بافر 10X رقیق و با رقت 0.5x استفاده گردید.
- محلول سنگین کننده 5X که بر اساس فرمول " گلیسرول ۵۰ درصد، بروموفنل بلو ۰/۴ درصد، NaH2PO4(pH=7,0.01 M) " تهیه شد.
- رنگ اتیدیوم بروماید با غلظت 0.1 µg/ml
- مارکر DNA (DNA Ladder 100bp Plus, CinnaGen)

پس از تهیه مواد و محلول‌های مورد نیاز ۱۰ میکرولیتراز محصول DNA با ۲/۵ میکرولیتر محلول سنگین‌کننده مخلوط گشته (نسبت ٤ به ۱)، سپس بر روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از تانک الکتروفورز (Paya-Pajoohesh-Pars Submerged Horizental Gel Electrophoresis) و بافر 0.5xTBE با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز و جداسازی انجام گردید. در نهایت با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از اشعه UV باند های جداشده قابل رویت گردیدند (Noaman and Shayan, 2010).

- **انجام PCR اولیه**: PCR اولیه برای تشخیص حضور باکتری‌های جنس آناپلاسما در نمونه‌های اخذ شده، بدون در نظر داشتن گونه خاصی انجام گرفت. بدین منظور از جفت آغازگر Anaplasma all استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن در تمامی گونه‌های آناپلاسما وجود دارد. مشخصات آغازگرهای بکار رفته به‌صورت زیر بود:

Forward strand primer: 5` AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3`

Reverse strand primer: 5'ACAGCTACCTTGTTACGACTT 3'

جهت انجام PCR اولیه محلول PCR طبق دستور زیر و به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد.

Template	2.5 میکرولیتر
Taq PCR buffer (10 x)	2.5 میکرولیتر
$MgCl_2$ (50 mM)	0.75 میکرولیتر
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP: 10 mM each)	0.5 میکرولیتر
Primer 1(Anaplasma all sense) (20µM)	0.5 میکرولیتر
Primer 2(Anaplasma all antisense) (20µM)	0.5 میکرولیتر
Taq DNA polymerase (5 U/ µl)	0.125 میکرولیتر
Distilled water	17.625 میکرولیتر

برای همه نمونه‌ها یک کنترل منفی (آب مقطر به جای نمونه) و یک کنترل مثبت (*آناپلاسما مارجیناله*) در نظر گرفته شد. بعد از آماده‌سازی محلول‌ها در تیوب اپندورف ۲۰۰ میکرولیتر، این تیوب‌ها در دستگاه ترموسیکلر (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) قرار گرفته و تحت برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام می‌گرفت:

Heated Lid	110^{oc}		
Denaturation step	95 ^{oc}	5'	
Start cycle	35- 40 ^{oc}		
Denaturation step	94 ^{oc}	45"	
Annealing step	55 ^{oc}	45"	35-40
Extension step	72 ^{oc}	1.5'	
End cycle			
Extention (End)	72 ^{oc}	10'	

لازم به ذکر است که محصول حاصله از تکثیر DNA الگوی استخراج‌شده به کمک آغازگرهای فوق، پس از انجام مراحل برنامه PCR مورد نظر، در مورد همه گونه‌های باکتری آناپلاسما، باندی به اندازه ۱٤٦۸ جفت باز می‌باشد که دربرگیرنده قطعه بسیار متغیر V1 (Hyper Variable Region) از ژن 16S rRNA جنس آناپلاسما است.

بعد از اتمام برنامه PCR، نمونه‌ها در دستگاه الکتروفورز (Gel electrophoresis chamber HUE-16S and Power supply electrophoresis EPS-600Z, Payapajoohesh Co., Tehran, Iran) حاوی محلول بافر الکتروفورز (0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, Sinacolone, Iran) و با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شدند. جهت ارزیابی باندهای به‌دست‌آمده مارکر سبک (100bp plus DNA Ladder, CinnaGen Co., Iran) در ژل مورداستفاده قرار گرفت (Weisberg *et al*, 1991).

– انجام nested PCR جهت تشخیص گونه‌های *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*: با توجه به این‌که نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغیر V1 ژن 16S rRNA در گونه‌های مختلف

آناپلاسما دارای تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای می‌باشند، لذا آغازگر اختصاصی برای تعیین گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* طراحی شد. در این مرحله با استفاده از محصول حاصله از PCR اولیه و با استفاده از آغازگرهای sense *Anaplasma phagocytophilum* (5'GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC 3') و Antisense *Anaplasma phagocytophilum* (5'CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC 3')، آزمایش neted PCR جهت تعیین گونه آناپلاسما برای هر نمونه انجام شد. در این آزمایش مواد با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر و بر اساس دستورالعمل تهیه گردید (Barlough *et al*., 1991).

Template (from primary PCR)	0.5 میکرو لیتر
Taq PCR buffer (10 x)	2 میکرو لیتر
$MgCl_2$ (50 mM)	0.6 میکرو لیتر
dNTP (dATP, dTTP,dCTP,dGTP :10 mM each)	0.4 میکرو لیتر
Primer 1(Anaplasma-nested sense) (20µM)	0.4 میکرو لیتر
Primer 2(**Antisense**) (20µM)	0.4 میکرو لیتر
Taq DNA polymerase (5 U/ µl)	0.1 میکرو لیتر
Distilled water	15.6 میکرو لیتر

برای همه نمونه‌ها یک کنترل منفی (آب مقطر به جای نمونه) و یک کنترل مثبت (*آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*) در نظر گرفته می‌شد. بعد از آماده‌سازی محلول‌ها در میکروتیوب‌های اپندورف ۲۰۰ میکرولیتری، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترمال سایکلر (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) قرارگرفته و تحت برنامه موردنظر تکثیر مکرر DNA به شرح ذیل انجام گرفت (Barlough *et al*., 1991).

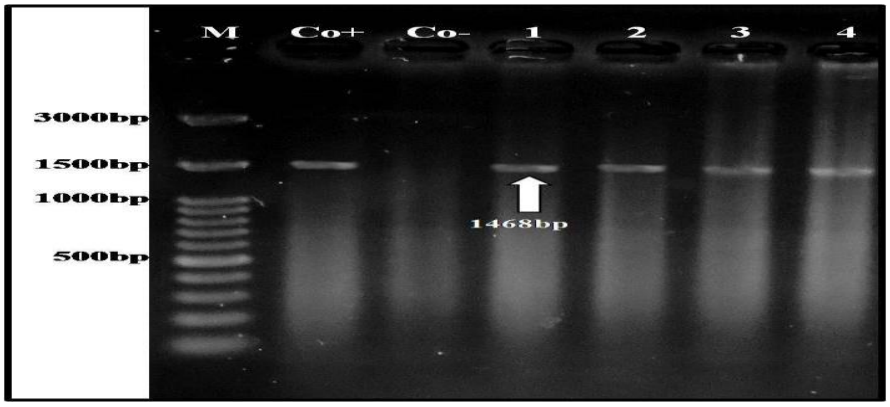
Heated Lid	110^{oc}	
Denaturation step	95 ^{oc}	5'
Start cycle	35- 40 ^{oc}	
Denaturation step	94 ^{oc}	45"
Annealing step	58 ^{oc}	45" 35-40
Extension step	72 ^{oc}	45"
End cycle		
Extention (End)	72 ^{oc}	10'

بعد از اتمام PCR نمونه‌ها در داخل گوده های ژل آگاروز (۱/۵٪ در محلول TBE ×0.5) قرار داده شده، و در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول 0.5x TBE با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شدند. مارکر سبک CinnaGen 100bp در ژل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت این ژل در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و نتیجه در دستگاه UV مشاهده و عکس‌برداری شد. لازم به ذکر است که اندازه باند مربوط به محصول nested PCR حاصله از تکثیر محصول PCR اولیه با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی فوق، به اندازه ۹۲۶ جفت باز می‌باشد.

- **تحلیل آماری داده‌ها:** از نرم‌افزار SPSS-18 و آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$)، جهت مقایسه درصد فراوانی آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* و همچنین مقایسه درصد آلودگی آن در فصول مختلف سال، سنین مختلف، جنس، ناقلین، ارتفاع از سطح دریا و نوع دامداری استفاده شد.

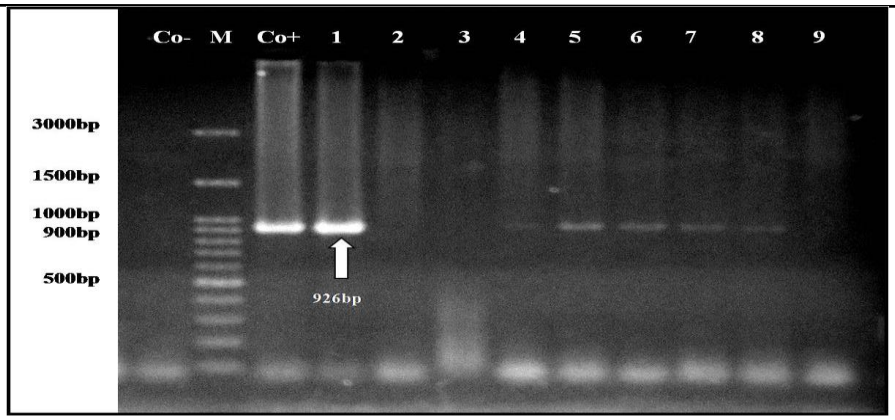
یافته‌ها

- **میزان آلودگی به باکتری جنس آناپلاسما در نمونه‌های مورد آزمایش:** بر اساس روش کار، به دنبال استخراج DNA از مجموع ٤٠٠ نمونه خون جمع‌آوری‌شده (۲۰۰ نمونه گاوی و ۲۰۰ نمونه گوسفندی) و انجام PCR اولیه (شکل۲)، در مجموع در طول یک سال اجرای طرح، از ۲۰۰ نمونه گاوی، تعداد ۷۰ نمونه (۳۵ درصد) و از ۲۰۰ نمونه گوسفندی تعداد ۳۸ نمونه (۱۹ درصد) از نظر آلودگی به جنس آناپلاسما مثبت بودند (جدول ۱).



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورزشده آزمون PCR اولیه جهت تشخیص حضور باکتری‌های جنس آناپلاسما در نمونه‌های خون گاوها و گوسفندان مورد آزمایش، که در آن اندازه باند مورد نظر ١٤٦٨ جفت باز بوده و شماره‌های ۱ تا ٤ نمونه‌های مثبت، -Co کنترل منفی، +Co کنترل مثبت و M مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده را نشان می‌دهد.

- **میزان آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در نمونه‌های مورد آزمایش:** جهت تعیین گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*، آزمون nested-PCR روی ۷۰ عدد نمونه های مثبت خون گاو و ۳۸ عدد نمونه های مثبت خون گوسفندان از PCR اولیه انجام شد که براساس نتایج حاصله، در ٦٦ مورد از ۲۰۰ نمونه خون گاوی (۳۳ درصد موارد) و در ۱۰ مورد از ۲۰۰ نمونه خون گوسفندی (۵ درصد موارد) باند موردنظر مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور گونه مذکور در نمونه‌ها بود (شکل ٤ و جدول ۱).



شکل ٤- تصویر ژل الکتروفورز شده **آزمون** nested-PCR جهت تشخیص *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*، که در آن ان دازه باند مورد نظر ۹۲٦ جفت باز بوده و شماره‌های ٤ تا ۸ نمونه‌های مثبت، شماره‌های ۲، ۳ و ۹ نمونه‌های منفی، -Co کنترل منفی، +Co کنترل مثبت و M مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده‌شده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- نتایج کلی حاصله از آزمون‌های مولکولی انجام‌شده روی نمونه‌های خونی گاوها و گوسفندان مورد آزمایش در استان گیلان

گونه دام مورد آزمایش	جنس و گونه باکتری آلوده کننده	تعداد نمونه خونی بررسی‌شده	فراوانی آلودگی	درصد آلودگی	حدود اطمینان ۹۵ درصد	
					بیشترین	کمترین
گاو	آناپلاسما	۲۰۰	۷۰	۳۵ درصد	٤٤/۸درصد	۲٦/٤درصد
	آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم	۲۰۰	٦٦	۳۳ درصد	٤۲/۷ درصد	۲٤/٦ درصد
گوسفند	آناپلاسما	۲۰۰	۳۸	۱۹ درصد	۲۷/۸ درصد	۱۲/۵ درصد
	آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم	۲۰۰	۱۰	۵ درصد	۱۱/۲ درصد	۲/۲ درصد

- **بررسی آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای مورد آزمایش بر اساس متغیرهای مورد مطالعه:** از ۲۰۰ رأس گاو مورد بررسی، ٦٦ رأس (۳۳ درصد) آلوده به باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بودند (جدول ۱). از طرف دیگر، بر اساس جدول ۲، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در شش ماه اول سال (بهار و تابستان)، ۳۵/۷ درصد و در شش ماه دوم (پائیز و زمستان)، ۲۹/۵ درصد بود که با مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در نمونه‌های خون گاوهای استان گیلان در دو نیمه اول و دوم سال ۱۳۹٦، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در سنین مختلف گاوهای مورد آزمایش، به ترتیب در ۱ الی۳ سالگی، ۲۳/۱ درصد، ۳ الی ۵ سالگی، ۳٦/٦ درصد و بالای ۵ سالگی، ۳۲/٦ درصد بود (جدول ۲) که در مقایسه فراوانی آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای استان گیلان در سنین مختلف نمونه‌گیری‌شده، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. بر اساس یافته‌های ارائه‌شده در جدول ۲، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب جنس نر و ماده به

ترتیب ۵۰ درصد و ۳۱/۵ درصد بود که با مقایسه فراوانی آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای استان گیلان در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده نیز، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. از طرف دیگر در ارتباط با میزان آلودگی گاوها به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ارتفاعات مختلف، مطابق نتایج ارائه‌شده در جدول ۲، مشخص گردید که به ترتیب در گاوهای مربوط به ارتفاعات کمتر از ۵۰۰ متر، ۲۷/۸ درصد و بالای ۵۰۰ متر، ۳٤/۱ درصد آلودگی به باکتری فوق وجود دارد که با مقایسه فراوانی آلودگی در نمونه‌های خونی تهیه‌شده از گاوهای مربوط به ارتفاعات مختلف بررسی‌شده در استان گیلان، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب ناقلین جداشده از سطح بدن گاوهای مورد بررسی، شامل پشه‌های گزنده و کنه‌ها به ترتیب ۳۰ و ٤۵ درصد بود که با مقایسه فراوانی‌های مذکور، مشخص گردید که در آلودگی گاوهای استان گیلان به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب نوع ناقلین مختلف نیز، اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. نهایتاً، براساس یافته‌های ارائه‌شده در جدول ۲، میزان آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* با توجه به نوع دامداری، در دامداری نیمه‌صنعتی ۳۱/۹ درصد و سنتی ۳۵/۵ درصد ثبت شده‌است که با مقایسه فراوانی‌های مذکور، مشاهده گردید که در میزان آلودگی گاوهای استان گیلان به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری‌شده نیز، اختلاف آماری معنی‌داری، مطرح نیست.

جدول ۲- رابطه آلودگی گاوهای استان گیلان به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* با متغیرهای مورد بررسی*

متغیر		*آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (مثبت)		*آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	*p*-value
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد			
فصل	بهار و تابستان	٤۰	۳۵/۷درصد	۷۲	٦٤/۳ درصد	۰/۸٤۸	۱	۰/۳۵۷
	پائیز و زمستان	۲٦	۲۹/۵ درصد	٦۲	۷۰/۵ درصد			
سن	۱-۳ سال	٦	۲۳/۱ درصد	۲۰	۷٦/۹ درصد	۱/٦٤۱	۲	۰/٤٤۰
	۳-۵ سال	۳۰	۳٦/٦ درصد	۵۲	٦۳/٤ درصد			
	>۵ سال	۳۰	۳۲/٦ درصد	٦۲	٦۷/٤ درصد			
جنس	نر	۸	۵۰ درصد	۸	۵۰ درصد	۲/۲۷۳	۱	۰/۱۳۲
	ماده	۵۸	۳۱/۵ درصد	۱۲٦	٦۸/۵ درصد			
ارتفاع از سطح دریا	**<۵۰۰ متر**	۱۰	۳۵/۷ درصد	۲٦	٦٤/۳ درصد	۰/۵٤۲	۱	۰/٤٦۲
	>۵۰۰ متر	۵٦	۲۹/۵ درصد	۱۰۸	۷۰/۵ درصد			

ناقلین	پشه‌های گزنده	٤٨	۳۰ درصد	۱۱۲	۷۰ درصد	۳/۲٥٦	۱	۰/۰۷۱
	کنه‌ها	۱۸	٤٥ درصد	۲۲	٥٥ درصد			
نوع دامداری	نیمه‌صنعتی	٤٤	٦۸/۱ درصد	۹٤	۳۱/۹ درصد	۰/۲٥۱	۱	۰/٦۱۷
	سنتی	۲۲	٦٤/٥ درصد	٤۰	۳٥/٥ درصد			

*: $p<۰/۰٥$

- بررسی آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان مورد آزمایش بر اساس متغیرهای مورد مطالعه: بر اساس جدول ۱، مشخص گردید که از ۲۰۰ رأس گوسفند مورد بررسی، ۱۰ رأس (۵ درصد) آلوده به باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بودند. همچنین بر اساس جدول ۳، میزان آلودگی گوسفندان به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در شش ماهه اول سال (بهار و تابستان)، صفر درصد و در شش ماهه دوم (پائیز و زمستان)، ۹/۳ درصد بود که در مقایسه فراوانی‌های مذکور، در میزان آلودگی به باکتری مذکور در نمونه‌های خونی اخذشده از گوسفندان استان گیلان، در دو نیمه اول و دوم سال ۱۳۹٦، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده گردید ($p<۰/۰٥$). از طرف دیگر میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در سنین مختلف گوسفندان مورد آزمایش، به ترتیب در ۱ الی۳ سالگی، صفر درصد، ۳ الی ۵ سالگی، ۵/۳ درصد بود (جدول ۳) که در مقایسه فراوانی‌های مربوط به آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان استان گیلان در سنین مختلف نمونه‌گیری‌شده، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. براساس یافته‌های ارائه‌شده در جدول ۳، میزان آلودگی گوسفندان مورد آزمایش، به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب جنس نر و ماده به ترتیب ۵/۱ و صفر درصد بود که با مقایسه فراوانی آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان استان گیلان در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری‌شده نیز اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. از طرف دیگر در خصوص میزان آلودگی گوسفندان مورد آزمایش به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ارتفاعات مختلف، با توجه به این‌که تعداد نمونه مربوط به دام‌های مستقر در مناطق با ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر، صفر بوده و کل نمونه‌های خون اخذ شده، مربوط به گوسفندان موجود در ارتفاع بالای ۵۰۰ متر از سطح دریا در مناطق تحت مطالعه استان گیلان بود (جدول ۳)، لذا در این خصوص، هیچ‌گونه مقایسه‌ای به لحاظ آماری انجام نشد. همچنین، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب ناقلین جداشده از سطح بدن گوسفندان مورد آزمایش، شامل پشه‌های گزنده و کنه‌ها به ترتیب ۵/۷ و صفر درصد بود (جدول ۳) که با مقایسه فراوانی‌های مذکور، مشخص گردید که در آلودگی گاوهای استان گیلان به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* برحسب نوع ناقلین مختلف نیز، اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد.

نهایتاً، براساس یافته‌های ارائه‌شده در جدول ۳، در مورد میزان آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* با توجه به نوع دامداری، با عنایت به

این‌که تعداد نمونه در دامداری نیمه‌صنعتی صفر بوده و کل نمونه‌های اخذ شده گوسفندی از دامداری‌های سنتی بوده است، لذا هم هیچ‌گونه مقایسه‌ای به لحاظ آماری انجام نشد.

جدول ۳- رابطه آلودگی گوسفندان استان گیلان به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* با متغیرهای مورد بررسی*

متغیر		*آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (مثبت)		*آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	*p*-value
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد			
فصل	بهار و تابستان	۰	۰درصد	۹۲	۱۰۰درصد	۸/۹٦۷	۱	۰/۰۰۳
	پائیز و زمستان	۱۰	۹/۳ درصد	۹۸	۹۰/۷ درصد			
سن	۱-۳ سال	۰	۰ درصد	۱۲	۱۰۰ درصد	۰/٦۷۲	۱	۰/٤۱۲
	۳-۵ سال	۱۰	۵/۳ درصد	۱۷۸	۹٤/۷ درصد			
جنس	نر	۱۰	۵/۱ درصد	۱۸۸	٤۹/۹ درصد	۰/۱۰٦	۱	۰/٤۷۷
	ماده	۰	۰ درصد	۲	۱۰۰ درصد			
ارتفاع از سطح دریا	۵۰۰> متر	۰	۰درصد	۰	۰ درصد	-	-	-
	۵۰۰< متر	۱۰	۵ درصد	۱۹۰	۹۵ درصد			
ناقلین	پشه‌های گزنده	۱۰	۵/۷درصد	۱٦٤	۹٤/۳ درصد	۱/۵۷۳	۱	۰/۲۱۰
	کنه‌ها	۰	۰ درصد	۲٦	۱۰۰ درصد			
نوع دامداری	نیمه‌صنعتی	۰	۰ درصد	۰	۰ درصد	-	-	-
	سنتی	۱۰	۵ درصد	۱۹۰	۹۵ درصد			

*: $p<۰/۰۵$

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین بررسی جامع اپیدمیولوژیک از آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در جمعیت گاوها و گوسفندان استان گیلان می‌باشد که با توجه به اهمیت موضوع، بحث حول نتایج آن در ۲ محور زیر انجام می‌پذیرد:

بر اساس بخشی از یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، مشخص گردید که از تعداد ۲۰۰رأس گاو مورد بررسی، ٦٦ رأس (۳۳ درصد)، به باکتری *آناپلاسما-فاگوسیتوفیلوم* آلوده بودند (جدول۱) که با مقایسه این یافته، با نتایج بررسی سایر محققان در کشور، نتیجه می-گیریم که این میزان نسبتاً بالا می‌باشد، به‌طوری‌که در تحقیقات نعمان و همکاران که به روش مولکولی در استان اصفهان انجام گرفته، ۱/۳۳ درصد از گاوها به لحاظ *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* مثبت بودند. ضمناً در تحقیقات آن‌ها نشانه‌های بالینی در گاوهایی که مثبت بودند، ثبت نشد و در بررسی اسمیرهای خونی دام‌های مورد مطالعه، هیچ‌گونه گنجیدگی در نوتروفیل‌ها مشاهده نگردید که این امر نشان از حامل بودن دام‌های مورد آزمایش بوده‌است (Noaman *et al*., 2016). به نظر می‌رسد یکی از دلایل مهم اختلاف فراوانی مشاهده‌شده، مربوط به این واقعیت هست که معمولاً نواحی جلگه‌ای واقع در جنوب دریای خزر، از مناطق مستعد فعالیت انواع بندپایان نظیر کنه‌های سخت محسوب می‌گردد که همین امر متعاقباً زمینه آلودگی با انواع عوامل عفونی منتقله توسط بندپایان، ازجمله گونه *آناپلاسمافاگوسیتوفیلوم* را فراهم می‌سازد. البته تحقیقاتی که در سایر کشورها هم صورت گرفته است، نتایج گوناگونی را نشان می‌دهد. به‌عنوان نمونه در آسیا، یانگ و همکاران در بررسی‌های خود روی گاوهای منطقه گانسو در شمال غربی چین، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* را ۳۵ درصد تعیین نمودند (Yang *et al*., 2013). آکتاز و همکاران، با انجام مطالعه مولکولی روی نمونه‌های خون مربوط به گاوهای حاضر در مراتع نقاط مختلف ترکیه، *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* را شایعترین گونه شناسائی شده با ۳۰/۸ درصد تعیین نمودند (Aktas *et al*., 2015). اوشیرو و همکاران، طی مطالعاتی در اوکیناوای ژاپن نشان دادند که ۱۲ نمونه (۸۰ درصد) از ۱۵ نمونه خون اخذشده از گاوهای این منطقه در آزمایش PCR بر اساس ژن 16S rRNA به لحاظ *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* مثبت شدند که این اولین گزارش مولکولی وجود *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ژاپن نیز بوده‌است (Ooshiro *et al*., 2008). همچنین تحقیقاتی که در کشورهای اروپائی به ثبت رسیده است، میزان آلودگی گاوها به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* با استفاده از روش مولکولی، از ٤ درصد در سوئیس (Hofmann-Lehmann *et al*., 2004)، ۵/۵ درصد در چکسلواکی (Hulínská *et al*., 2004)، ۱۷درصد در ایتالیا (Torina *et al*., 2008)، ۱۹ درصد در اسپانیا (de la Fuente *et al*., 2005)، تا ۲۰ درصد در فرانسه (Laloy *et al*., 2009) متغییر می‌باشد. از طرف دیگر بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در شش ماه اول سال (بهار و تابستان)، (۳۵/۷ درصد) و در شش ماه دوم (پائیز و زمستان)، (۲۹/۵ درصد) می‌باشد. اگرچه درصد آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در نیمه سال اول به‌مراتب بیشتر از نیمه سال دوم بوده است، اما در مقایسه فراوانی در دو نیمه اول و دوم سال، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده

نگردید (جدول ۲). تحقیقات محمد و همکاران از ایالت پنجاب پاکستان نیز همین نتایج را نشان می‌دهد، به‌طوری‌که میزان شیوع آلودگی گاوها در شش ماه اول سال برابر (۵ درصد) و در شش ماه دوم سال برابر (۲/۹ درصد) تعیین گردید (Muhammad *et al.*, 2014). اصولاً در نوار ساحلی دریای خزر و دامنه جنوبی رشته کوه البرز، همه‌ساله هم‌زمان با فرارسیدن فصول بهار و تابستان، به‌دلیل بارندگی، رطوبت نسبی بالا، افزایش دما و همچنین شروع مهاجرت دام‌ها، فعالیت اکثر کنه‌های سخت در دام‌های نشخوارکننده گسترش می‌یابد که این امر خود منجر به استفاده گسترده از سموم ضد انگل‌های خارجی توسط دامداران این مناطق می‌گردد. با توجه به نقش بندپایان و به‌خصوص کنه‌های خانواده ایسکودیده در انتقال گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*، بنابراین، میزان بالای آلودگی گاوها به باکتری فوق، در شش ماه اول سال دور از انتظار نیست، اگرچه این تفاوت معنی‌دار نبود. اما نعمان و همکاران، مغایر با نتایج پژوهش حاضر، بیشترین میزان آلودگی به *آناپلاسماfاگوسیتوفیلوم* در گاوهای مناطق فلات کوهستان ایران را در فصل پائیز عنوان نمودند (Noaman *et al.*, 2016). در توجیه تفاوت مشاهده‌شده، به نظر می‌رسد که نباید نوع گونه کنه‌های سخت مؤثر در انتقال این باکتری را از نظر دور داشت. همچنین بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر مشخص شد که میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای تحت مطالعه در سنین مختلف به ترتیب ۲۳/۱ درصد در ۱ الی ۳ سالگی، ۳۶/۶ درصد در ۳ الی ۵ سالگی و ۳۲/۶ درصد در بالای ۵ سالگی می‌باشد (جدول ۲) که با افزایش سن دام‌ها، درصد آلودگی نیز افزایش داشته و بیشترین آلودگی در سنین بین ۳ تا ۵ سالگی ثبت شده‌است. البته هرچند با مقایسه فراوانی آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گاوهای سنین مختلف نمونه‌گیری‌شده استان گیلان، اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نگردید ولی به‌نظر می‌رسد که با افزایش سن، امکان انتقال *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* به گاوها توسط کنه‌های آلوده زیادتر می‌باشد. اما در این ارتباط نتایج تحقیقات حیدر وهمکاران در سال ۲۰۱۹ در مورد گاوهای استان القادسیه عراق هم نشان داده که با افزایش سن دام، میزان آلودگی به گونه‌های مختلف آناپلاسما به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته است (Hayder *et al*. 2019) که عدم‌همخوانی مشخصی را با یافته‌های پژوهش حاضر در این مورد نشان می‌دهد. از طرف دیگر میزان آلودگی گاوهای استان گیلان به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در تحقیق حاضر، برحسب جنس نر و ماده به ترتیب ۵۰ و ۳۱/۵ درصد ثبت شد (جدول ۲) که این اختلاف هم از نظر آماری معنی‌دار نیست و با نتایج سایر محققان نیز همخوانی کامل ندارد. به‌طوری‌که براساس نتایج تحقیقات حیدر و همکاران که بر روی گاوهای استان القادسیه عراق انجام گرفته، میزان آلودگی به گونه‌های مختلف آناپلاسما در گاوهای نر ۲٤/۲ درصد و گاوهای ماده ۳۲/۲ درصد بوده‌است (Hayder *et al*., 2019). همچنین در تحقیقات تای و همکاران در مالزی (Tay *et al*., 2014)، آواد و همکاران در سودان (Awad *et al*., 2011) و هانن و همکاران در تانزانیا (Hanène *et al*., 2004) نیز، درصد آلودگی به گونه‌های مختلف آناپلاسما در دام‌های ماده بیشتر از دام‌های نر بوده، اگرچه این تفاوت هم از نظر آماری، معنی‌دار نبوده است. در این خصوص انتظار بر این است که

دام‌های ماده درصورتی‌که از سن بالاتری برخوردار باشند، به دلیل این‌که مدت طولانی‌تری در معرض آلودگی قرار دارند، به‌مراتب، درصد آلودگی در آن‌ها بیشتر از جنس نر باشد، وگرنه تأثیر جنسیت بر میزان درصد آلودگی و ارتباط آن با فاکتورهائی نظیر هورمون‌ها و سایر شرایط فیزیولوژیک دام‌ها، تحقیقات گسترده و مدونی را در این زمینه طلب می‌کند. همچنین در ارتباط با میزان آلودگی گاوها به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ارتفاعات مختلف از سطح دریا، بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر مشخص شد که فراوانی مذکور در مورد گاوهای مربوط به ارتفاعات کمتر از ۵۰۰ متر، ۲۷/۸ درصد و در مورد گاوهای مربوط به ارتفاعات بالای ۵۰۰ متر، ۳٤/۱ درصد می‌باشد (جدول ۲) که البته این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود. در همین راستا، تحقیقات نعمان و همکاران در استان خوزستان (Noaman and Moradi, 2019) نشان می‌دهد که درصد آلودگی گاوها به گونه های آناپلاسما در مناطق کوهستانی استان خوزستان (٦۰ درصد) و در مناطق جلگه‌ای (٤۲/۲ درصد) است. احتمالاً به دلیل شرایط جغرافیائی موجود در ارتفاعات بالای ۵۰۰ متر از سطح دریا، شاهد تنوع بیشتری از کنه‌های سخت ناقل عامل عفونی نسبت به ارتفاعات پائین تر از ۵۰۰ متر می‌باشیم. لذا همین موضوع سبب افزایش درصد آلودگی بیشتر خواهد شد. از طرف دیگر فراوانی آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در تحقیق حاضر، برحسب ناقلین جداشده از سطح بدن گاوهای مورد آزمایش، شامل پشه‌های گزنده و کنه‌ها به ترتیب ۳۰ و ٤۵ درصد ثبت شد (جدول ۲) که اختلاف مشاهده‌شده در این مورد هم، از نظر آماری معنی‌دار نبود. همان‌طورکه نتایج نشان می‌دهد، میزان آلودگی به *آناپلاسما-فاگوسیتوفیلوم* در مورد دام‌های آلوده به کنه بیشتر از دام‌های آلوده به سایر بندپایان می‌باشد که این امر نقش و اهمیت کنه‌های سخت را در این خصوص نشان می‌دهد. در این ارتباط بشیربد و همکاران به بررسی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* روی کنه گونه *ایکسودس ریسینوس* (*Ixodes ricinus*) جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف قائم‌شهر پرداختند که در نتیجه ۵/۱ درصد از کنه‌های مورد مطالعه، آلوده به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بودند (Bashiribod *et al.*, 2004). از طرف دیگر گرچه اکثر منابع علمی معتبر موجود در دنیا هم از نقش موثر کنه‌های سخت و بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس در انتقال گونه‌های مختلف آناپلاسما یاد می‌کنند، اما نمی‌توان از نقش بندپایان دیگر نظیر مگس‌های خانواده تابانیده و پشه‌ها در انتقال مکانیکی آن‌ها به‌صورت فصلی، غافل شد (Leatch, 1973). اما بالاخره در مطالعه حاضر، در بررسی ارتباط بین میزان آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* و نوع دامداری (نیمه‌صنعتی و سنتی)، فراوانی‌های مربوطه، به ترتیب ۳۱/۹ درصد در دامداری‌های نیمه‌صنعتی و ۳۵/۵ درصد در دامداری‌های سنتی ثبت شد (جدول ۲). که از نظر آماری اختلاف مشاهده‌شده نیز، معنی‌دار نبود. در همین راستا، تحقیقات نعمان و همکاران در استان خوزستان (Noaman and Moradi, 2019) نشان می‌دهد که درصد آلودگی گاوها به گونه های آناپلاسما در گاوداری‌ها با شرایط بهداشتی ایده‌آل و صنعتی (۲ درصد)، و در گاوداری‌ها با شرایط غیر بهداشتی و سنتی (۵۰ درصد) است. البته در توجیه اختلاف مشاهده‌شده به نظر می‌رسد که رعایت اصول

نسبی بهداشتی نظیر تعویض سرسوزن، دفع بهداشتی زباله‌ها و مدفوع دام‌ها، استفاده از سموم کنه‌کش و استفاده از دورکننده‌های حشرات در دامداری‌های نیمه‌صنعتی، شرایط بهداشتی مناسب‌تری را فراهم می‌نماید که طبعاً در کاهش آلودگی دام‌ها به باکتری مذکور نقش دارد.

از طرف دیگر بر اساس بخش دیگری از نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، از ۲۰۰ رأس گوسفند مورد بررسی، ۱۰ رأس (۵ درصد) آلوده به باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* بودند (جدول ۱) که این میزان در مقایسه با درصد آلودگی گاوها به باکتری مذکور در این مناطق و همچنین نتایج سایر محققان بسیار اندک می‌باشد، به‌طوری‌که واحدی و نعمان، طی تحقیقی روی گوسفندان استان مازندران، میزان آلودگی آن‌ها به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* را ۲۳/۲ درصد تعیین نمودند (Vahedi and Noaman, 2020). همچنین، میزان مذکور در تحقیقات انجام‌شده در مناطق مرکزی و جنوب غربی چین ۳۵/۱ درصد، در مناطق شمال و غرب چین ٤۲/۹ درصد، نروژ ۳۷/۵ درصد، دانمارک ۱۱/٦ درصد و ایتالیا ۱۱/۵ درصد تعیین گردیده‌است (Kiilerich *et al.*, 2009; Torina *et al.*, 2010; Stuen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016). نتایج تحقیقات انجام‌شده در عراق و آلمان هم، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* را به‌ترتیب ٤/۷۱ درصد (Hamzah and Hasso, 2019) و ٤ درصد (Scharf *et al.*, 2011) مشخص کرده‌است. در سال‌های اخیر، مبارزه با انگل‌های خارجی، به‌خصوص کنه‌ها در گوسفندان بسیار رایج گردیده‌است. از آنجائی که نقش کنه‌ها در انتقال بیولوژیکی گونه‌های مختلف آناپلاسما بسیار قابل‌توجه می‌باشد، لذا یکی از دلایل کاهش آلودگی به گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در منطقه مورد مطالعه می‌تواند همین عامل باشد (Leatch, 1973). همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر، میزان آلودگی گوسفندان استان گیلان به باکتری *آناپلاسماfاگوسیتوفیلوم* در شش ماه اول سال (بهار و تابستان)، صفر درصد و در شش ماه دوم (پائیز و زمستان)، ۹/۳ درصد ثبت شد (جدول ۳) که با انجام آزمون کای دو، اختلاف آماری مشاهده شده، معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). البته این یافته‌ها برخلاف نتایج تحقیقات محمد و همکاران از ایالت پنجاب پاکستان (Muhammad *et al.*, 2014) و ایساوی و همکاران از کشور سودان می‌باشد (Eisawi *et al.*, 2020). با توجه به این‌که در نوار ساحلی دریای خزر و دامنه جنوبی رشته کوه‌های البرز، همه‌ساله هم‌زمان با فرارسیدن فصول بهار و تابستان، فعالیت اکثر کنه‌های سخت در دام‌های نشخوارکننده گسترش می‌یابد، همین امر منجر به استفاده گسترده از سموم ضد انگل‌های خارجی توسط دامداران این مناطق می‌گردد. با توجه به نقش بندپایان و به‌خصوص کنه‌های خانواده ایسکودیده در انتقال گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم*، بنابراین، مبارزه با انگل‌های خارجی، به‌خصوص کنه‌ها در گوسفندان، یک عامل مهم در کاهش بروز آلودگی در این دسته از حیوانات در فصول مذکور می‌باشد. البته عوامل دیگری نظیر شرایط دامداری، مدیریت مزرعه و نحوه مبارزه با بیماری‌های دامی را هم نباید از نظر دور داشت. درعین حال، بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر مشخص شد که میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان تحت مطالعه در سنین مختلف به ترتیب صفر درصد در ۱ الی ۳ سالگی، ۵/۳ درصد در ۳ الی ۵ سالگی می‌باشد

(جدول ۳). البته اختلاف مشاهده‌شده، از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات حمزه و هاسو در سال ۲۰۱۹ از عراق (Hamzah and Hasso, 2019)، بن ساید و همکاران در سال ۲۰۱۸ در شمال افریقا که نشان دادند با افزایش سن دام، درصد آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در گوسفندان افزایش یافته است (Ben Said *et al.*, 2018)، مطابقت دارد. با توجه به این‌که بیشترین آلودگی در سنین بین ۳ تا ۵ سالگی ثبت شده، به نظر می‌رسد که با افزایش سن دام‌ها، امکان انتقال *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* به گوسفندان توسط کنه‌های آلوده و در نهایت مزمن شدن عفونت فراهم می گردد. از طرف دیگر میزان آلودگی گوسفندان استان گیلان به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در تحقیق حاضر، برحسب جنس نر و ماده به ترتیب ۵/۱ و صفر درصد ثبت شد (جدول ۳) که این اختلاف هم از نظر آماری معنی‌دار نیست و با نتایج سایر محققان همخوانی ندارد، زیرا در اکثر تحقیقات آلودگی در جنس ماده بیشتر از جنس نر گزارش شده که شاید دلیل آن تمایل بیشتر باکتری به جنس ماده، نسبت به جنس نر باشد (Elhassan *et al.*, 2014). در ضمن دام‌های ماده درصورتی‌که از سن بالاتری برخوردار باشند، به دلیل اینکه مدت طولانی‌تری در معرض آلودگی قرار دارند، به‌مراتب، درصد آلودگی در آن‌ها بیشتر از جنس نر می-تواند باشد. البته در مطالعه ما، اکثر نمونه‌های مورد بررسی مربوط به جنس نر بودند و شاید دلیل آن‌هم کم بودن تعداد دام‌های ماده، جهت مطالعه باشد. همچنین در ارتباط با میزان آلودگی گوسفندان به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در ارتفاعات مختلف، توجه به این نکته ضروری است که تمامی نمونه‌های مورد مطالعه ما، از دام‌های مستقر در ارتفاعات بالای ۵۰۰ متر از سطح دریا در استان گیلان جمع‌آوری گردیده است (جدول ۳) و هرگونه اظهارنظر در این زمینه منوط به نمونه‌گیری از ارتفاعات پائین‌تر از ۵۰۰ متر و مقایسه آن با نمونه‌های مربوط به ارتفاعات بالای ۵۰۰ متر از سطح دریا می‌باشد. همچنین هرگونه مقایسه یافته‌های این بخش از تحقیق حاضر با نتایج سایر محققان در ارتباط با عامل ارتفاع از سطح دریا، نیازمند شناخت دقیق از سایر فاکتورهای تأثیرگذار، نظیر نوع پوشش گیاهی، میزان بارندگی و همچنین طول و عرض جغرافیائی منطقه نیز می‌باشد.

از طرف دیگر فراوانی آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* در تحقیق حاضر، برحسب ناقلین جداشده از سطح بدن گوسفندان مورد آزمایش، شامل پشه‌های گزنده و کنه‌ها به ترتیب ۵/۷ و صفر درصد ثبت شد(جدول۳) که اختلاف مشاهده شده در این مورد هم، از نظر آماری معنی‌دار نبود. از آنجائی که مبارزه برعلیه کنه‌ها، بخصوص در گوسفندان در سال‌های اخیر در بین دامداران منطقه بسیار رایج و متداول می‌باشد، لذا شاهد آلودگی کمتر گوسفندان به کنه‌ها می‌باشیم. از طرفی اکثر منابع علمی معتبر موجود در دنیا از نقش مؤثر کنه‌های سخت و بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس در انتقال گونه‌های مختلف آناپلاسما یاد می‌کنند، اما نمی‌توان از نقش‌بندپایان دیگر نظیر مگس‌های خانواده تابانیده و پشه‌ها به‌صورت فصلی در انتقال مکانیکی آنها غافل ماند (Annen *et al.*, 2012). بالاخره در مطالعه حاضر، در بررسی ارتباط بین میزان آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* و نوع دامداری (نیمه‌صنعتی و سنتی)، با

توجه به این‌که تعداد نمونه اخذشده از دامداری نیمه‌صنعتی صفر بوده و کل نمونه‌های گوسفندی از دامداری‌های سنتی بوده است (جدول ۳)، لذا در این خصوص، هیچ‌گونه مقایسه‌ای نمی‌تواند انجام شود. از دیرباز شیوه پرورش گوسفند به دلایل اقتصادی در نقاط مختلف دنیا و همچنین کشور برخلاف گاو، به شکل سیستم مرتع بوده و هست و سیستم صنعتی بسیار اندک و یا اینکه در مناطقی مثل استان‌های شمالی کشور مرسوم نمی‌باشد. لذا در این تحقیق هیچ‌گونه نمونه‌ای از گوسفندان سیستم صنعتی و یا نیمه‌صنعتی اخذ نشده است، اما مسلماً رعایت اصول نسبی بهداشتی نظیر تعویض سرسوزن، دفع بهداشتی زباله‌ها و مدفوع دام‌ها، استفاده از سموم کنه‌کش و دورکننده‌های حشرات در دامداری‌های نیمه‌صنعتی، شرایط بهداشت مناسب‌تری را فراهم می‌نماید که طبعاً در کاهش آلودگی نقش دارد.

به طور کلی، نتایج تحقیق حاضر، حاکی از آلودگی دام‌های استان گیلان به باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* است. با توجه به این‌که باکتری مذکور، مشترک بین انسان و دام می‌باشد، به‌هرحال دام‌هایی که به نحوی آلوده هستند، این آلودگی باعث عفونت پایدار در آن‌ها شده و می‌تواند خطر بالقوه و جدی برای جمعیت انسانی در استان به‌حساب آیند. با توجه به جمعیت انسانی استان گیلان و همچنین فعالیت بسیار بالای کنه‌ها و وجود اکوسیستم مناسب برای مخازن، حاملین و ناقلین باکتری مذکور و از طرفی حجم بالای گردشگری در مناطق جنگلی استان، این امر دور از انتظار نبوده و ازجمله مسائل بسیار مهمی می‌باشد که باید موردتوجه مسئولین محترم بهداشتی استان و همچنین متخصصان بیماری‌های عفونی قرار گیرد. در ضمن لازم است در زمینه بررسی این باکتری در جمعیت انسانی استان و همچنین ناقلین و مخازن، تحقیقات گسترده‌تری صورت پذیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به خاطر تامین هزینه اجرای این طرح تحقیقاتی قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Ahmadi-Hamedani, M., Khaki, Z., Rahbari, S., Kazemi, B. and Bandehpour, M. (2009). Molecular identification of anaplasmosis in goats using a new PCR-RFLP method. Iranian Journal of Veterinary Research, 10(29): 367-372.
- Aktas, M. and Özübek, S. (2015). Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by Anaplasma phagocytophilum. Veterinary Microbiology, 178(3-4): 246-251.
- Awad, H., Antunes, S., Galindo, R.C., do Rosario, V.E., de la Fuente, J., Domingos, A., *et al*. (2011) Prevalence and genetic diversity of Babesia and Anaplasma species in cattle in Sudan, Veterinary

Parasitology, 181(2-4): 146-152.
- Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J. and Straus, T. (2012) Two cases of transfusion-transmitted Anaplasma phagocytophilum. American Journal of Clinical Pathology, 137(4): 562-565
- Barlough, J.E., Madigan, J.E., DeRock, E. and Bigornia, L. (1996). Nested polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia equi genomic DNA in horses and ticks (Ixodes pacificus). Veterinary Parasitology, 63(3-4): 319-329.
- Bashiribod, H, Kazemi, K., Eslami, G., Bigdeli, S., Bandehpour, M., Rahbarian, N., *et al*. (2004). First molecular detection of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks in Iran. Journal of Medical Sciences, 4(4): 282-286.
- Ben Said, M.B., Belkahia, H. and Messadi, L. (2018). Anaplasma spp. in North Africa: a review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. Vector-borne and zoonotic diseases, 9(3): 543-555.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A. and Kocan, K.M. (2016). Anaplasma-phagocytophilum uses common strategies for infection of ticks and vertebrate hosts. Trends in Microbiology, 24(3): 173-180.
- de la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz- Fons, F., Hofle, U., Fernandez De Mera, I.G., Villanua, D., *et al*. (2005b). Potential vertebrate reservoir hosts and in vertebrate vectors of Anaplasma marginale and A. phagocytophilum in central Spain. Vector Borne Zoonotic Diseases, 5(4): 390-401.
- Eisawi, N., El Hussein, A., Hassan, D., Musa, A., Hussien, M., Enan, K., *et al*. (2020) A molecular prevalence survey on Anaplasma infection among domestic ruminants in Khartoum State, Sudan. Tropical Animal Health and Production, 52(4): 1845-1852.
- Elhassan, A.M., Mansour, M.E.A., Shamon, A.A.A., and El Hussein, A.M. (2014) A Serological Survey of Akabane Virus Infection in Cattle in Sudan. ISRN. Veterinary Science, 2014: 123904.
- Gaowa Yoshikawa, Y., Ohashi, N., Wu, D., Kawamori, F., Ikegaya, A., Watanabe, T., *et al*. (2014). Anaplasma phagocytophilum antibodies in humans, Japan, 2010-2011. Emerging Infectious Diseases, 20(3): 508-509.
- Grøva, L., Olesen, I., Steinshamn, H. and Stuen, S. (2011). Prevalence of Anaplasma phagocytophilum infection and effect on lamb growth. Acta Veterinaria Scandinnavia, 53(1): 30.
- Hayder N.A., Yahia I.K. and Qassim H.K. (2019). Molecular detection and phylogenetic analysis of Anaplasma spp in cattle in Al-Qadisiyah province of Iraq. Macedonian Veterinary Review, 42(2): 181-188.
- Hamzah, K.J. and Hasso, S.A. (2019). Molecular prevalence of Anaplasma phagocytophilum in sheep from Iraq. Open Veterinary Journal, 9(3): 238-245.
- Hanène, B., Mourad, B.S., Alberto, A., Khaoula, A.Z.I., Dorra, H., Mohamed, G., *et al*. (2015). First molecular survey and novel genetic variants' identification of Anaplasma marginale, A.centrale and A.bovis in cattle from Tunisia. Infection, Genetics and Evolution, 34(1): 361-371.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., *et al*. (2004). Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. Journal of Clinical Microbiology, 42(8): 3775-3780.
- Hosseini-Vasoukolaei, N., Oshaghi, M.A., Shayan, P., Vatandoost, H., Babama hmoudi, F., Yaghoobi - Ershadi, M.R., et al. (2014). Anaplasma Infection in ticks, livestock and human in Ghaemshahr, Mazandaran province, Iran. Iranian Journal of Arthropod Borne Disease, 8(2): 204-211.
- Hulínská, D., Langøová, K., Pejèoch, M., and Pavlásek, I. (2004). Detection of Anaplasma-phagocytophilum in animals by real-time polymerase chain reaction. Journal of Pathology, Microbiolgy and Immunology, 112(4-5): 239-247.
- Jalali, S.M., Khaki, Z., Kazemi, B., Bandehpour, M., Rahbari, S., Jalali M.R., *et al*. (2013). Molecular detection and identification of Anaplasma species in sheep from Ahvaz, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 14(1): 50-56.
- Kiilerich, A.M., Christensen, H. and Thamsborg, S.M. (2009). Anaplasma phagocytophilum in Danish

sheep: confirmation by DNA sequencing. Acta Veterinaria Scandinnavia, 51(1): 55.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A. and Melendez, R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle. Clinical Microbiology Reviews, 16(4): 698-712.
- Laloy, E., Petit, E., Boulouis, H.J., Gandoin, C., Bouillin, C., Gounot, G., *et al*. (2009). Dynamics of natural infection by Anaplasma phagocytophilum in a dairy cattle herd in Brittany, France. Clinical Microbiology and Infection, 15(2): 24-25.
- Leatch, G. (1973). Preliminary studies on the transmission of Anaplasma marginale by Boophilus-microplus. Australian Veterinary Journal, 49(1): 16-19.
- Muhammad, S.S., Rao Muhammmad, S.S., Ahmad Khan, Z.I. and Muhammad, N.K. (2014). Prevalence and Risk Factors of Anaplasmosis in Cattle and Buffalo Populations of District Khanewal, Punjab, Pakistan. Global Veterinaria, 12(1): 146-153.
- Noaman, V. (2017) A review of anaplasmosis and the prevalence of Anaplasma marginale in cattle in Iran and the world. Veterinary Researches & Biological Products, 116(3): 2-15. [In Persian]
- Noaman, V. (2019). A review on Anaplasma phagocytophilum as a zoonotic agent. Tehran University Medical Journal, 76(12): 778-785. [In Persian]
- Noaman, V., Allameh, S.K. and Nabavi, R. (2017). Anaplasmosis in Ruminants of Iran: An Overview. Advanced Techniques in Clinical Microbiology, 1(2): 1-3.
- Noaman, V. and Moradi, M. (2019). Molecular epidemiology and risk factors assessment of Anaplasma spp. on dairy cattle in Southwest of Iran. Acta Veterinaria Eurasia, 45(1): 30-36.
- Noaman, V., Nabinejad, A., Shahmoradi, A. and Esmaeilkhanian, S. (2016). Molecular detection of bovine leukocytic Anaplasma species in Isfahan, Iran. Research in Molecular Medicine, 4(2): 47-51.
- Noaman, V. and Shayan, P. (2010). Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of Anaplasma marginale in carrier cattle. Iranian Journal of Microbiology, 2(2): 89-94.
- Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Katagiri, Y. and Inokuma, H. (2008). Detection of Anaplasma bovis and Anaplasma phagocytophilum from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. Veterinary Parasitology, 154(3-4): 360-364.
- Razmi, G.R., Dastjerdi, K., Hosseini, H., Naghibi, A., Barati, F. and Aslani, M.R. (2006). An epidemiological study on Anaplasma infection in cattle, sheep and goats in Mashhad suburb, Khorasan province, Iran. Annals of the New York Academy of Sciences, 1078(1): 479-481.
- Salehi-Guilandeh, S., Sadeghi-Dehkordi, Z., Sadeghi Nasab, A. and Yousefi, A. (2018). Molecular detection of Anaplasma spp. in cattle of Talesh County, North of Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 22(4): 457-465.
- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt- Kiener, D., Liebisch, G., *et al*. (2011). Distinct host species correlate with Anaplasma phagocytophilum ankA gene clusters. Journal of Clinical Microbiology, 49(3): 790-796.
- Stuen, S., Granquist, E.G. and Silaghi, C. (2013). Anaplasma phagocytophilum: a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3(3): 31.
- Stuen, S., Pettersen, K.S., Granquist, E.G., Bergström, K., Bown, K.J. and Birtles, R.J. (2013). Anaplasma phagocytophilum variants in sympatric red deer (Cervus elaphus) and sheep in southern Norway. Ticks and Tick Borne Disease, 4(3):197-201.
- Stuen S., Torsteinbo, W.O., Bergstrom, K. and Bardsen, K. (2009). Superinfection occurs in Anaplasma-phagocytophilum infected sheep irrespective of infection phase and protection status. Acta Veterinaria Scandinavica, 51(41): 1-6.
- Tay, S.T., Koh, F.X., Kho, K.L. and Ong, B.L. (2014). Molecular survey and sequence analysis of Anaplasma spp. in cattle and ticks in a Malaysian farm. Tropical Biomedicine, 31(4): 769-776.
- Torina, A. and Caracappa, S. (2007). Anaplasmosis in cattle in Italy. Veterinary Research Communications, 31(1): 73-78.
- Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Scimeca, S., Nicosia, S., Di Marco, V., *et al*. (2008b). Characterization of Anaplasma infections in Sicily, Italy. Annals of the New York Academy of Sciences, 1149(1): 90-93.

●Torina, A., Galindo, R.C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., *et al*. (2010). Characterization of Anaplasma phagocytophilum and A. ovis infection inanaturally infected sheep flock with poor health condition. Tropical Animal Health and Production, 42(7): 1327-31.

● Vahedi Noori, N. and Noaman, V. (2020). Molecular Identification of Anaplasma pathogenic species in Sheep in Mazandaran Province. Veterinary Researches & Biological Products, 33(2): 29-41. [In Persian]

●Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697-703.

● Yang, J., Liu, Z., Niu, Q., Liu, G., Han, R., Guan, G., *et al*. (2016). Anaplasma phagocytophilum in sheep and goats in central and southeastern China. Parasites and Vectors, 9(593): 1-7

●Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Liu, Q., Li, Y., Chen, Z., *et al*. (2013). Prevalence of Anaplasma-phagocytophilum in ruminants, rodents and ticks in Gansu, North-Western China. Journal of Medical Microbiology, 62(2): 254-258.

●Yousefi, A., Rahbari, S., Shayan, P., Sadeghi-Dehkordi, Z. and Ahomar, A.B. (2017). Molecular evidence of Anaplasma phagocytophilum: An emerging tick-borne pathogen in domesticated small ruminant of Iran; first report. Comparative Clinical Pathology, 26(3): 637-642.