DOI: 10.22092/vj.2019.124181.1524
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شناسائی ملکولی گونه‌های بیماریزای آناپلاسما در گوسفندان استان مازندران

• **نصرالله واحدی نوری (نویسنده مسئول)**
استادیار، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **وحید نعمان**
دانشیار، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۲۶-۰۸-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۰۸-۰۲-۱۳۹۸
Email: nsvahedi@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های آناپلاسما در گوسفندان استان مازندران بود. برای این منظور تعداد ۹۵ نمونه خون از طریق رگ وداج گوسفند بطور تصادفی از نقاط مختلف استان مازندران جمع‌آوری گردید. در ابتدا DNA استخراجی از نمونه‌های خونی با جفت آغازگری که قطعه ۱۴۶۸ جفت بازی از ژن ۱۶S rRNA جنس آناپلاسما را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. سپس جهت افزایش حساسیت آزمون، محصول PCR اولیه با جفت آغازگری که قطعه ۳۴۵ جفت بازی از ژن ۱۶S rRNA جنس آناپلاسما را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. ۷۰ نمونه (۷۳/۷٪) از ۹۵ نمونه اخذ شده در اولین PCR و nested-PCR از نظر جنس آناپلاسما مثبت شدند. تمامی نمونه‌های مثبت با nested-PCR اختصاصی از نظر وجود آناپلاسما فاگوسیتوفیلم بررسی شدند و۲۲ نمونه(۲۳/۲٪) از نظر آناپلاسما فاگوسیتوفیلم مثبت تشخیص داده شد. DNA استخراجی نمونه‌های مثبت با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که قطعه ۸۶۶ جفت بازی از ژن msp4 آناپلاسما اوویس را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. ۵۶ نمونه (۵۸/۹٪) از۹۵ نمونه از نظر آناپلاسما اوویس مثبت بودند. این مطالعه اولین تشخیص ملکولی گونه‌های آناپلاسما در گوسفندان در استان مازندران است. نتایج نشان می‌دهد که در بین درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسمافاگوسیتوفیلوم، در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌دار وجود دارد (p<۰/۰۵). همچنین از نظر آلودگی به آناپلاسما اوویس، از میان متغیرهای مورد بررسی، بین فصول مختلف، ارتفاع از سطح دریا، جنس و طول جغرافیائی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (p<۰/۰۵).

کلمات کلیدی: ملکولی، گونه‌های آناپلاسما، گوسفندان، مازندران

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 29-41

Molecular Identification of Anaplasma pathogenic Species in Sheep in Mazandaran Province

By: Vahedi Noori . N., (Corresponding Author) Animal Parasitic Disease Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Noaman, V., Animal Parasitic Disease Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2018-11-17 Accepted: 2019-04-28

Email: nsvahedi@yahoo.com

The aim of this study was to determinate the variety of Anaplasma species among sheep of Mazandaran province. For this purpose, a total of 95 blood samples were collected via the jugular vein from healthy sheep randomly.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. 70 (73.7%) out of 95 sheep blood samples were Anaplasma spp. positive by first PCR and nested PCR. All sheep positive samples were analysed for the presence of *A. phagocytophilum* and 22 of sheep blood samples (23.2%) were positive for *A.phagocytophilum*. The extracted DNA from positive Anaplasma spp. samples were amplified by *Anaplasma ovis* specific primers, which amplify an approximately 866bp DNA fragment from region of *msp4* gene. 56 out of 95 sheep blood samples (58.9%) were positive for *Anaplasma ovis*. This study is the first molecular detection of Anaplasma species from sheep in Mazandaran province. The results show that there is a significant difference among the percentage of sheep infection to *Anaplasma phagocytophilum* with different seasons of the year (P<0.05). Also, there are a significant difference among the percentage of sheep infection to *anaplasma ovis* with different seasons of the year, above sea level, sex and longitude (P<0.05).

Key words: Molecular, Anaplasma Species, Sheep, Mazandaran

مقدمه

باکتری جنس آناپلاسما، متعلق به سلسله پروکاریوت‌ها، راسته ریکتزیاله و خانواده آناپلاسماتسه آ می‌باشد (۱۰). جنس آناپلاسما شامل باکتری‌های ریز، گرم منفی می‌باشند که بطور اختصاصی در داخل سیتوپلاسم سلول‌های خونی (نوتروفیل، ماکروفاژها، منوسیت و گلبول‌های قرمزخون) و یا در بافت پوششی رگ‌های خونی میزبان‌های مختلف بسر می‌برند (۱۲). این جنس از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت است. اگرچه در محیط‌هائی که این باکتری‌ها برای سال‌های متوالی حضور فعال داشته و تکثیر می‌نماید، بسیاری از مهره‌داران به عنوان مخزن آن عمل می‌نمایند، اما در موارد زیادی، گونه‌های جنس آناپلاسما در حیوانات اهلی و انسان سبب بیماری می‌گردند (۴۲). گونه‌های آناپلاسما مارجیناله، اوویس و سنتراله، گلبول‌های قرمزنشخوارکنندگان و گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم که به گرانولوسیت‌ها حمله می‌نماید، برای انواع حیوان اهلی و وحشی و همچنین انسان بیماری‌زا می‌باشد (۴۱). یک بخش مهم در چرخه زندگی این باکتری‌ها، ناقلین می‌باشند که در انتشار آنها در محیط نقش بسزائی دارند. اصلی‌ترین ناقلین باکتری آناپلاسما در نقاط مختلف دنیا، کنه‌های سخت شامل جنس‌های: ایکسودس، ریپی سفالوس، درماسنتور و آمبلیوما می‌باشند (۲۸). آناپلاسموزیس، ناشی از آناپلاسما اوویس، یکی از گسترده‌ترین بیماری‌های منتقله در کشورهای مدیترانه و خاورمیانه است و از کشورهای مختلفی از جمله ایران، ترکیه، عراق و اردن گزارش شده است (۴۰). بسیاری از عوامل از جمله تنوع جغرافیایی و آب و هوایی، گونه‌های کنه و میزبان مخزن ممکن است با حضور و فراوانی آناپلاسما اوویس در مناطق مختلف در ارتباط باشد. در ایران آلودگی با آناپلاسما اوویس در نشخوارکنندگان کوچك به روش‌های رنگ‌آمیزی و ملکولی از استان‌های خراسان رضوی، اصفهان، مازندران، آذربایجان غربی و خوزستان گزارش شده است(۱۴، ۱۶، ۳۳، ۳۵، ۳۹).

آناپلاسما فاگوسیتوفیلم که قبلاً تحت عنوان ارلیشیا فاگوسیتوفیلا نامیده می‌شد ممکن است در بسیاری از حیوانات و انسان ایجاد بیماری کند. تظاهرات بالینی ناشی از این عامل بیماری‌زا در گوسفند، بز، گاو، اسب، سگ، گربه، گوزن و انسان گزارش شده است. بیماری در نشخوارکنندگان به نام تب ناشی از کنه نیز نامیده می‌شود. این بیماری در گاو و گوسفند با تب بالا، کاهش تولید شیر، وجود گنجیدگی در نوتروفیل‌های محیطی، لوکوپنی، سقط و کاهش باروری دیده می‌شود. در گاو و گوسفند، دوره انکوباسیون بیماری ۴-۹ روز و دوره تب از ۱ تا ۱۳ روز متغیر است و

www.SID.ir

Archive of SID

علایم درمانگاهی به‌صورت خفیف تا متوسط بروز می‌کند و به ندرت باعث مرگ دام می‌شود. عواملی همچون آب و هوا، مدیریت، سلامت دام، عفونت‌های دیگر و شرایط فردی دام در ظهور بیماری دخیلند. بیماری ناشی از آناپلاسما فاگوسیتوفیلم در اکثر کشورهای دنیا گزارش شده است (۳۷، ۳۸) در ایران عامل بیماری در گاو، نشخوارکنندگان کوچك و کنه به ترتیب در استان‌های اصفهان، همدان و مازندران گزارش شده است (۵، ۳۶، ۳۸، ۵۲)

بهرحال آناپلاسموزیس از نظر اقتصادی ضررهای زیادی را به صنعت دامپروری کشورهای جهان وارد ساخته، بطوری‌که در ایالات متحده آمریکا خسارات سالانه ۳۰۰ میلیون دلار و در آمریکای لاتین این خسارات تقریباً ۸۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود (۲۳). در ایران خسارات ناشی از بیماری برآورد نشده است. سالانه همزمان با فصول گرم سال و افزایش ناقلین بندپا، شاهد ظهور این بیماری می‌باشیم که خسارات جبران ناپذیری را به دامداران تحمیل می‌کند. آزمایش میکروسکوپیک اسلایدهای خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا تنها می‌تواند جهت تائید آناپلاسموزیس حاد بکار گرفته شود و جهت شناسایی دام‌هائی که عفونت پایدار دارند و بعنوان مخزن برای انتقال در گله محسوب می‌شوند، قابل استفاده نیست (۳۲). در ضمن تشخیص و تفریق سرولوژیکی گونه‌های آناپلاسما به علت واکنش‌های متقاطع بین گونه‌ای امکان پذیر نمی‌باشد و این روش‌ها فاقد حساسیت و ویژگی قابل اعتماد نسبت به آزمایش‌های مولکولی می‌باشند. علی‌رغم تحقیقاتی که تاکنون در ایران برروی شناسائی گونه‌های آناپلاسما در ایران صورت گرفته است، با این وجود، تحقیقات در زمینه شناسائی مولکولی گونه‌های بیماری‌زا و رایج آناپلاسما در کشورو عوامل موثر بر آن محدود بوده و عمده گزارش‌ها بر مبنای شناسائی میکروسکوپی می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر، ارائه بیشتر اطلاعات در زمینه گونه‌های بیماری‌زای آناپلاسما و شناسائی و تفریق گونه‌های مختلف و رایج آن در گوسفندان استان مازندران و در ادامه عوامل موثر در شیوع آنها در منطقه می‌باشد.

روش کار

این تحقیق برروی گوسفندان استان مازندران انجام گردید. برای این منظور در طول یک سال، بصورت تصادفی از ۹۵ راس گوسفند به ظاهر سالم از نقاط مختلف استان(ساری-قائم شهر-بابل و آمل)، نمونه گیری خون بعمل آمده است. از هر دام ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در فریزر(۲۰ درجه سانتی‌گراد)جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید. همزمان متغیرهایی نظیر: سن، جنس، فصل، موقعیت جغرافیائی منطقه و نوع دامداری، در فرم مخصوص ثبت گردید. سن دام براساس بررسی دندان‌ها تعیین گردید. همچنین دام‌های مورد بررسی نیز همگی دورگ (آمیخته) بودند.

جهت شناسائی مولکولی آناپلاسما در گوسفندان مراحل ذیل انجام گردید.

استخراج DNA

برای این منظور، نمونه‌های خون را از فریزر خارج و در دمای اتاق قرار داده، پس از ذوب، تقریباً ۵۰ µl از هر نمونه را در داخل تیوب اپندورف ۱/۵ cm ۳ ریخته، سپس با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA تولید شده 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.

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 در تمامی گونه‌های آناپلاسما وجود دارد. 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 ۱۴۶۸ جفت باز خواهد بود. محصول تکثیر شده توسط این جفت آغازگر دربرگیرنده قطعه بسیار متغیر V1 (Hyper Variable Region) از ژن ۱۶S rRNA جنس آناپلاسما است. بعد از اتمام PCR ، نمونه‌ها در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول TBE ۰،۵x و با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شدند. جهت ارزیابی باندهای بدست آمده مارکر سبک (۱۰۰bp plus DNA Ladder) ساخت شرکت Cinna Gen در ژل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت این ژل را بمدت۲۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید قرار داده و پس از رنگ‌آمیزی نتیجه با دستگاه UV مشاهده و عکس‌برداری انجام گرفت.

Nested PCR

جهت تائید قطعه تکثیر شده در PCR اولیه که توسط آغازگرهای Anaplasma all تکثیر شد، دو آغازگر در داخل قطعه تکثیر شده طراحی گردید. این دو آغازگر جدید اگرچه گونه خاصی از آناپلاسما را تکثیر نمی‌کرد و جنس آناپلاسما را تشخیص می‌داد ولی به جهت تایید تشخیص DNA تکثیری درمحصول اولیه و اطمینان از عدم تکثیر DNA ارگانیسم‌های دیگر و واکنش‌های مثبت و منفی کاذب ضروری بود. در قطعه تکثیری حاصل از آغازگرهای Anaplasma-nested- Sense و Anaplasma-nested- Antisense ، قسمت بسیار متغیر ژن ۱۶S rRNA نیز تکثیر می‌شود. بنابر این از قطعه مذکور نیز می‌توان در جهت تشخیص گونه استفاده نمود.

بعد از اتمام PCR نمونه‌ها در داخل گودهای ژل آگاروز (۱/۵٪ در محلول TBE ۰،۵×) قرار داده شده، در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول TBE ۰،۵x با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شد. مارکر سبک ۱۰۰bp CinnaGen در ژل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت این ژل در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و نتیجه در دستگاه UV مشاهده و عکسبرداری شد. در صورت مشاهده باندی با وزن ۳۴۵ bp ، نمونه مثبت تلقی و صحت PCR اولیه تائید می‌شود.

Nested PCR جهت تشخیص گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلم

rRNA در گونه آناپلاسمای فوق دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای می‌باشند، لذا آغازگرهای sense اختصاصی برای گونه‌های آناپلاسما فاگوسیتوفیلم طراحی شد. آغازگرهای بکار رفته به صورت زیر بوده است.

'Forward strand primer: 5'GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC 3

www.SID.ir

Archive of SID

'Reverse strand primer: 5'CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC 3

بنابراین با استفاده از محصول PCR اولیه (۱۴۶۸ bp) و با آغازگرهای sense و Antisense اختصاصی آزمایش تعیین گونه nested PCR برای هر نمونه انجام شد. در این آزمایش مواد با حجم کلی ۲۰µl و بر اساس دستورالعمل تهیه گردید. بعد از آماده سازی محلولها در تیوب اپندورف ۲۰۰µl، این تیوبها در دستگاه ترموسیکلر (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) قرار گرفته و تحت برنامه مورد نظر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت. نتیجه بعد از الکتروفورز روی ژل و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر UV مشاهده و عکسبرداری شد. در صورتیکه نمونه با هر جفت از آغازگرهای اختصاصی آناپلاسما فاگوسیتوفیلم تکثیرمی شد، باندی در حدود ۹۲۶ bp روی ژل مشاهده می گردید و گونه آناپلاسما در رابطه با آغازگری که واکنش داشت، تعیین می گردید.

PCR جهت تکثیر گونه های آناپلاسما اوویس با استفاده از ژن msp4

برای این منظور آغازگرهای اختصاصی طراحی شد که بتواند فقط ژن msp4 گونه آناپلاسما اوویس را در خون گوسفند تکثیر نماید. محصول مورد انتظار حاصل از تکثیر این دو آغازگر باندی در حدود ۸۶۶ bp بود. آغازگرهای بکار رفته به صورت زیر بوده است.

Forward strand primer: 5' GGGAGCTCCTATGAATTA-'CAGAGAATTGTTTAC3

Reverse strand primer: 5'CCGGATCCTTAGCTGAACAG-'GAATCTTGC3

در صورتیکه نمونه با هر جفت از آغازگرهای اختصاصی آناپلاسما اوویس تکثیر می شد، باندی در حدود ۸۶۶ bp روی ژل مشاهده می گردید و گونه آناپلاسما اوویس تعیین می‌شد.

از نرم افزار SAS ۹/۴ و آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵٪ ($p<0/05$)، جهت مقایسه درصد فراوانی آلودگی در گونه‌های مختلف شناسائی شده آناپلاسما و همچنین مقایسه درصد آلودگی هر یک از آنها در فصول مختلف سال، سنین مختلف، جنس دام، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیائی و نوع دامداری استفاده شد.

نتایج

الف: شناسائی گونه‌های آناپلاسما در گوسفندان

بر اساس روش کار، بدنبال استخراج DNA و انجام PCR اولیه و سپس جهت تائید تشخیص PCR اولیه با روش nested-PCR، نتایج تکثیر با جفت آغازگر مربوطه، محصولی به اندازه ۳۴۵ bp ایجاد کرد که با اندازه محصول مورد انتظار کاملاً منطبق بود (شکل ۱).

در مجموع در طول یکسال اجرای طرح، از ۹۵ راس گوسفند نمونه‌گیری خون بعمل آمده است .لازم به یادآوری است که تعداد ۷۰ نمونه (۷۳/۷٪) در PCR اولیه و نهایتاً nested-PCR از نظر آلودگی با جنس آناپلاسما مثبت بودند (جدول ۱).

جهت تعیین گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلم، محصول PCR اولیه با جفت آغازگر Anaplasma-phagocytophilum-sense و Anaplasma-phagocytophilum-Antisense تکثیر شد که در نتیجه آن، از ۹۵ نمونه اولیه، ۲۲ نمونه (۲۳/۲٪) باند مورد نظر مشاهده شد (شکل ۲).

همچنین جهت تعیین گونه آناپلاسما اوویس، DNA (۹۵ نمونه گوسفندی) با ژن ۱۶SrRNA، توسط جفت آغازگر اختصاصی Anaplasma ovis sense و Anaplasma ovis Antisense برگرفته از ژن msp4 تکثیر شدند که در نتیجه آن ۵۶ نمونه(۵۸/۹ ٪) از نمونه‌های مثبت اولیه، محصول مورد نظر bp ۸۶۶ مشاهده شد (شکل۳).

ب: آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان بر اساس متغیرهای مورد مطالعه

از ۹۵ راس گوسفند مورد بررسی، ۲۲ راس (۲۳/۲ ٪) آلوده به باکتری آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم بودند (جدول۱). بر اساس (جدول ۲)، درصد آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در فصول مختلف سال، به ترتیب بهار (۱۸/۲٪)، تابستان (۵۷/۲٪)، پائیز (۱۸/۲٪) و زمستان(۱۶/۷٪) می‌باشد.

در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران و در فصول مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<0/05$) (جدول ۲).

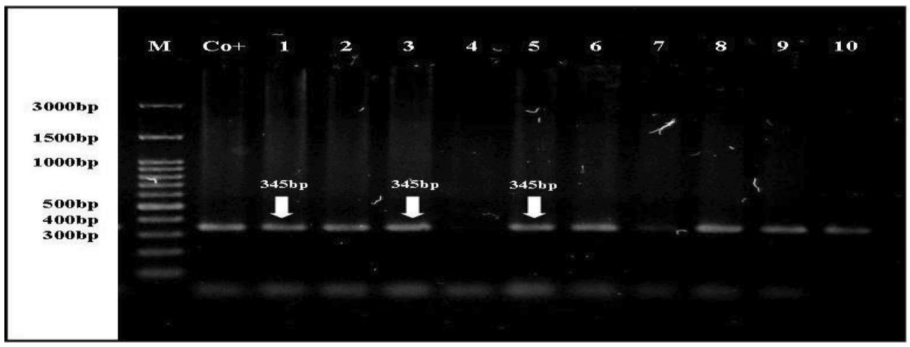
همچنین درصد آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در بین گوسفندان و در سنین مختلف به ترتیب کمتر از ۱ سال(۵۰٪)،۱ الی ۳سال (۲۷/۷٪)، ۳ - ۵ سال (۱۱/۱٪) و بالای ۵ سال (۰٪) می باشد (جدول۲). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در سنین مختلف نمونه گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($p<0/05$) (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج کلی حاصله از آزمونهای ملکولی نمونه های خونی گوسفندان مازندران

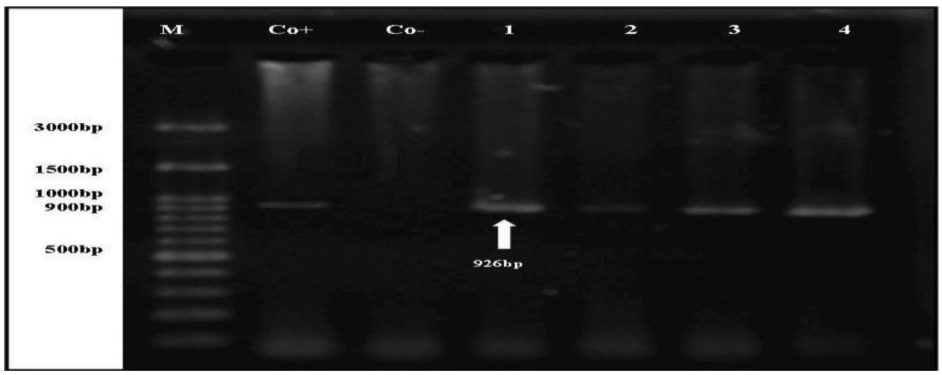
نوع دام	گونه های آناپلاسما	تعداد مورد بررسی	فراوانی آلودگی	درصد	حدود اطمینان ۹۵٪	
					کمترین	بیشترین
گوسفند	آناپلاسما	۹۵	۷۰	٪ ۷۳/۷	٪۶۴	٪ ۸۱/۵
	آناپلاسما فاگوسیتوفیلم	۹۵	۲۲	٪ ۲۳/۲	٪ ۴۸/۹	٪ ۳۲/۶
	آناپلاسما اوویس	۹۵	۵۶	٪ ۵۸/۹	٪ ۱۵/۸	٪ ۶۸/۳

www.SID.ir

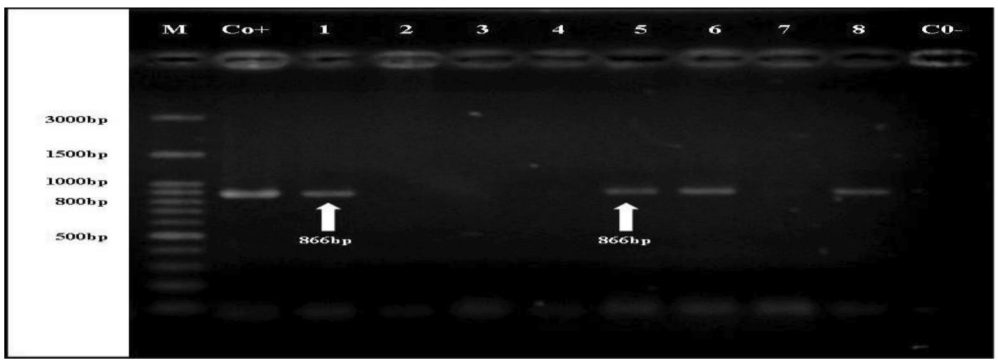
Archive of SID



شکل ۱ - ۱ تا ۱۰ نمونه های PCR اولیه و تکثیر شده با جفت آغازگر Anaplasma-nested با محصول ۳۴۵ bp



شکل ۲- ۱-۴ - آناپلاسما فاگوسیتوفیلم ۹۲۶ bp (تکثیر شده با پرایمر اختصاصی)



شکل ۳ - ۱ - ۸ نمونه های تکثیر شده با جفت آغازگر Anaplasma ovis sense و Anaplasma ovis Antisense محصول ۸۶۶ bp

www.SID.ir

Archive of SID

درصد آلودگی به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در این تحقیق بر حسب جنس نر و ماده به ترتیب (۴۰٪) و (۲۰٪) می‌باشد(جدول ۲). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو ،اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در ارتفاعات مختلف، به ترتیب ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر (۲۱/۲ ٪)، ۵۰۰ - ۱۵۰۰ متر (۰ ٪) و بالای ۱۵۰۰ متر (۳۲ ٪) بدست آمده است(جدول ۲). درمقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در ارتفاعات مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو ،اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

همچنین نتایج نشان می‌دهد، درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در طول جغرافیائی۵۳-۵۱ درجه (۲۴/۲٪) وبیشتراز ۵۳ درجه (۰٪) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در طول جغرافیائی مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم و نوع دامداری (سنتی-نیمه صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۲۴/۴٪) و نیمه صنعتی (۱۵/۴٪) بدست آمده است (جدول ۲). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران درارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

پ: آلودگی آناپلاسما اوویس در گوسفندان بر اساس متغیرهای مورد مطالعه

از ۹۵ راس گوسفند مورد بررسی، ۵۶ راس (۵۸/۹ ٪) آلوده به باکتری آناپلاسما اوویس بودند(جدول۱). بر اساس نتایج بدست آمده (جدول ۳)، درصد آلودگی آناپلاسما اوویس در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار (۴۰/۹٪)، تابستان (۲۱/۵٪) ، پائیز (۵۴/۵٪) و زمستان(۷۹/۱٪) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس درگوسفندان استان مازندران در فصول مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

همچنین درصد آلودگی آناپلاسما اوویس دربین گوسفندان و درسنین مختلف به ترتیب کمتر از ۱ سال(۰٪)، ۱-۳ سال (۵۸/۵٪)، ۳ - ۵ سال (۶۶/۶٪) و بالای ۵ سال (۰٪) می باشد جدول(۳). درمقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس درگوسفندان استان مازندران در سنین مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

در این تحقیق، درصد آلودگی به آناپلاسما اوویس بر حسب جنس نر و ماده به ترتیب (۳۳/۳٪) و (۶۳/۸٪) می‌باشد جدول (۳). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس درگوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما اوویس در ارتفاعات مختلف، به ترتیب ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر (۵۹/۱ ٪)، ۵۰۰ - ۱۵۰۰ متر (۰ ٪) و بالای ۱۵۰۰ متر(۶۸ ٪) بدست آمده است جدول (۳). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسما اوویس درطول جغرافیائی ۵۳- ۵۱ درجه (۶۳/۵٪) و ۵۳ درجه (۰٪) می‌باشد جدول (۳). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در طول جغرافیائی مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما اوویس و نوع دامداری(سنتی-نیمه صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۶۰/۱٪) و نیمه صنعتی(۴۶/۲٪) بدست آمده است جدول (۳). در مقایسه فراوانی گونه آناپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، بحث نیز حول سه محور مورد بررسی قرار می‌گیرد.

الف: شناسائی گونه‌های آناپلاسما در گوسفندان مازندران

از مجموع ۹۵ نمونه DNA استخراج شده از خون گوسفندان استان مازندران، ۷۰ نمونه (۷۳/۷ ٪) در PCR اولیه و nested PCR از نظر جنس آناپلاسما مثبت بودند(جدول ۱). نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان داخل و خارج از کشور نیز تا حدودی منطبق می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط احمدی و همکاران (۲۰۰۹) در استان خراسان رضوی و گلستان با استفاده از روش مولکولی و تکثیر قطعه‌ای از ژن msp4 انجام گرفت، ۶۳/۷٪ از بزهای مورد مطالعه از نظر آناپلاسما مثبت بودند (۱). در بررسی دیگر که توسط اسپیتالسکا و همکاران (۲۰۰۵) بر روی گوسفندان استان فارس(شیراز) انجام شد، میزان شیوع آناپلاسما به روش مولکولی و تکثیر قطعه ژن ۱۶SrRNA، ۲۹٪ برآورد گردید (۴۵). جلالی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی‌های خود برروی گوسفندان منطقه اهواز، نیز با روش مولکولی و تکثیر قطعه ژنی ۱۶SrRNA، میزان شیوع آناپلاسما را در ۸۷/۴٪ تعیین نمودند (۱۶).

بر اساس روش کار، نمونه‌گیری از گوسفندانی بعمل آمده است که فاقد هر گونه علائم بالینی آناپلاسموزیس بودند. اگرچه آناپلاسموزیس گاوی بیماری مهمی است که باعث ضررهای زیادی به صنعت گاوداری می‌گردد، آناپلاسموزیس گوسفندی معمولاً باعث بیماری شدید نمی‌شود و تنها در برخی از موارد، گوسفندان در معرض استرس یا عوامل مساعدکننده، نشانه‌های بالینی آناپلاسموزیس را نشان می‌دهند. بهر حال دام‌هایی که به نحوی با گونه‌های آناپلاسما آلوده می‌شوند، این آلودگی باعث عفونت پایدار در دام شده و می‌تواند خطر بالقوه‌ای برای حیوان و صنعت دامداری باشد (۱۱). همانطور که در قسمت نتایج آمده است، درصدآلودگی گوسفندان در این تحقیق(۷۳/۷ ٪) تعیین گردیده است که

www.SID.ir

Archive of SID

درصد بالائی می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک خطر جدی برای جمیعت دامی و حتی انسانی نیز در استان بحساب آید. از طرف دیگر میزان میکروارگانیسم در خون دام‌های حامل آناپلاسما بسیار پائین می‌باشد، بنابراین تشخیص آناپلاسما در دام‌های حامل بطریق میکروسکوپیک روش مناسبی نیست، زیرا علاوه بر اینکه این روش در بسیاری از موارد قادر به تشخیص دام‌های حامل نمی‌باشد، در صورت تشخیص نیز قادر به تفریق اجرام آناپلاسمایی از ذرات رنگ، اجسام هاول ژولی و اجسام هینز نیست (۴۹). Kieser و همکاران (۱۹۹۰) اعلام کردند آلودگی کمتر از ۰/۱٪ گلبول‌های قرمز در گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده، قابل تشخیص نمی‌باشد (۲۰). بنابراین با توجه به معایب روش‌های میکروسکوپیک و سرولوژی، بهترین روش تشخیص، روش تشخیص ملکولی آناپلاسما بر اساس PCR در دام‌های حامل می‌باشد و این روش در حال حاضر به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص گونه‌های آناپلاسما به شمار می‌آید (۴۱) روش مولکولی توانایی تشخیص کمتر از ۵۰-۱۰ گلبول قرمز یا سفید آلوده به آناپلاسما را در میلی لیتر خون دارد (۱۵، ۳۱).

ب: بررسی شیوع آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان

جهت تعیین گونه‌های آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم، محصول PCR اولیه با جفت آغازگرهای Anaplasma-phagocytophilum-sense و Anaplasma-phagocytophilum-Antisense برگرفته از ژن ۱۶S rRNA تکثیر شدند که درنتیجه آن ۲۲ نمونه (۲۳/۲ ٪) به لحاظ آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم از ۹۵ نمونه اولیه باند مورد نظر (bp ۹۲۶) را تشکیل دادند (شکل ۲) (جدول ۱). تاکنون در مازندران گزارش مستندی بر پایه آزمایش‌های سرمی و ملکولی مبنی بر حضور آناپلاسما فاگوسیتوفیلم در دام و انسان مشاهده

جدول ۲- رابطه آلودگی گوسفندان مازندران به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم و متغییرهای مورد بررسی*

متغیر		آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم (مثبت)		آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	P-Value
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد			
فصل	بهار	۴	٪۱۸/۲	۱۸	٪۸۱/۸	۱۰/۶۸۲	۳	۰/۰۱۴
	تابستان	۸	٪۵۷/۲	۶	٪۴۲/۸			
	پائیز	۲	٪۱۸/۲	۹	٪۸۱/۸			
	زمستان	۸	٪۱۶/۷	۴۰	٪۸۳/۳			
سن	۱< سال	۱	٪۵۰	۱	٪۵۰	۰/۰۶۴	۳	۰/۲۵۵
	۱-۳ سال	۱۸	٪۲۷/۷	۴۷	٪۷۲/۳			
	۳-۵ سال	۳	٪۱۱/۱	۲۴	٪۸۸/۹			
	۵ > سال	۰	٪۰	۱	٪۱۰۰			
جنس	نر	۶	٪۴۰	۹	٪۶۰	۲/۸۳۹	۱	۰/۰۹۲
	ماده	۱۶	٪۲۰	۶۴	٪۸۰			
ارتفاع از سطح دریا	۵۰۰< متر	۱۴	٪۲۱/۲	۵۲	٪۷۸/۸	۲/۴۴۴	۲	۰/۲۹۴
	۵۰۰-۱۵۰۰	۰	٪۰	۴	٪۱۰۰			
	۱۵۰۰ >	۸	٪۳۲	۱۷	٪۶۸			
طول جغرافیائی	°۵۱ -۵۳	۲۲	٪۲۴/۲	۶۹	٪۷۵/۸	۱/۲۵۸	۱	۰/۲۶۲
	°۵۳ >	۰	٪۰	۴	٪۱۰۰			
نوع دامداری	سنتی	۲۰	٪۲۴/۴	۶۲	٪۷۵/۶	۰/۵۱۱	۱	۰/۴۷۵
	نیمه صنعتی	۲	٪۱۵/۴	۱۱	٪۸۴/۶			

* ($p < ۰/۰۵$)

www.SID.ir

Archive of SID

نشده و این تحقیق اولین گزارش تشخیص ملکولی آناپلاسما فاگوسیتوفیلم درگوسفندان مازندران می‌باشد. در بررسی گروا و همکاران (۲۰۱۱) در نروژ برروی بره‌ها، میزان آلودگی ۵۵٪ تعیین گردید (۱۳). آناپلاسما فاگوسیتوفیلم که قبلاً تحت عنوان ارلیشیا فاگوسیتوفیلا نامیده می‌شد، در بسیاری از حیوانات از جمله انسان ایجاد بیماری کرده و تظاهرات بالینی ناشی از این عامل بیماری‌زا در گوسفند، بز، گاو، اسب، سگ، گربه، گوزن و انسان گزارش شده است (۴۷). بیماری در نشخوارکنندگان به نام تب ناشی از کنه نیز نامیده می‌شود. این بیماری در گاو و گوسفند با تب بالا، کاهش تولید شیر، وجود گنجیدگی در نوتروفیل‌های محیطی، لوکوپنی، سقط و کاهش باروری دیده می‌شود. درگاو و گوسفند، دوره انکوباسیون بیماری ۴-۹ روز و دوره تب از ۱ تا ۱۳ روز متغیر است و علایم درمانگاهی بصورت خفیف تا متوسط بروز می‌کند و به ندرت باعث مرگ دام می‌شود. عواملی همچون آب و هوا، مدیریت، سلامت دام، عفونت‌های دیگر و شرایط فردی دام در ظهور بیماری دخیلند (۲). در این تحقیق درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در فصل تابستان، بیشتر از سایر فصول می‌باشد (۵۷/۲٪) (جدول۲). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می باشد ($p<۰/۰۵$). با توجه به اینکه انتقال و شیوع آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در میان دام‌ها بستگی به فعالیت کنه ها و حشرات ناقل دارد (۴۹) و تابستان، فصل فعالیت بالای کنه‌ها و همچنین پشه‌های ناقل در استان مازندران می‌باشد (۵۱)، لذا انتظار می‌رود که در فصل تابستان شدت و تنوع آلودگی کنه‌ها به مراتب بیشتر از سایر فصول نیز باشد. Torina (۲۰۰۷) در تحقیقات خود تحت عنوان آناپلاسموز در دام‌های ایتالیا، عنوان می‌کند آناپلاسما فاگوسیتوفیلم نسبت به آناپلاسما مارجیناله طیف وسیع‌تری از میزبان‌ها

جدول ۳- رابطه آلودگی گوسفندان مازندران به آناپلاسما اوویس **و متغییرهای مورد بررسی** *

متغیر		آناپلاسما اوویس (مثبت)		آناپلاسما اوویس (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	P-Value
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد			
فصل	بهار	۹	٪۴۰/۹	۱۳	٪۵۹/۱	۱۹/۲۹۹	۳	۰/۰۱
	تابستان	۳	٪۲۱/۵	۱۱	٪۷۸/۵			
	پائیز	۶	٪۵۴/۵	۵	٪۴۵/۵			
	زمستان	۳۸	٪۷۹/۱	۱۰	٪۲۰/۹			
سن	۱< سال	۰	٪۰	۲	٪۱۰۰	۴/۹۷۹	۳	۰/۱۷۳
	۱-۳ سال	۳۸	٪۵۸/۵	۲۷	٪۴۱/۵			
	۳-۵ سال	۱۸	٪۶۶/۶	۹	٪۳۳/۴			
	۵سال >	۰	٪۰	۱	٪۱۰۰			
جنس	نر	۵	٪۳۳/۳	۱۰	٪۶۶/۷	۴/۸۲۹	۱	۰/۰۲۸
	ماده	۵۱	٪۶۳/۸	۲۹	٪۳۶/۲			
ارتفاع از سطح دریا	۵۰۰< متر	۳۹	٪۵۹/۱	۲۷	٪۴۰/۹	۶/۵۹۱	۲	۰/۰۳۷
	۵۰۰-۱۵۰۰	۰	٪۰	۴	٪۱۰۰			
	۱۵۰۰ >	۱۷	٪۶۸	۸	٪۲۲			
طول جغرافیائی	°۵۱ -۵۳	۵۶	٪۶۳/۵	۳۵	٪۳۶/۵	۵/۹۹۶	۱	۰/۰۱۴
	°۵۳ >	۰	٪۰	۴	٪۱۰۰			
نوع دامداری	سنتی	۵۰	٪۶۰/۱	۳۲	٪۳۹/۹	۱/۰۱۹	۱	۰/۳۱۳
	نیمه صنعتی	۶	٪۴۲/۸	۷	٪۵۷/۲			

* ($p < ۰/۰۵$)

www.SID.ir

Archive of SID

و مکان‌های جغرافیایی را در بر می‌گیرد و علاوه بر کنه ایکسودس رسینوس، جنس‌های دیگر کنه نیز ناقل این عامل می‌باشند (۵۰). آناپلاسما فاگوسیتوفیلم عمدتاً از طریق کنه‌های جنس ایکسودس منتقل می‌شود. این کنه‌ها در ایالات متحده آمریکا ایکسودس اسکپولاریس، ایکسودس پاسیفیکوس، ایکسودس اسپینیپالپیس، در انگلستان ایکسودس تری انگولیسپس، قسمت عمده ای از اروپا و آفریقا ایکسودس رسینوس و در شرق اروپا و آسیا ایکسودس پرسولکاتوس می‌باشند (۴۸). علاوه بر ایکسودس رسینوس که در کل اروپا ناقل آناپلاسما فاگوسیتوفیلم است (۴۶) انتقال آناپلاسما فاگوسیتوفیلم در ارتباط با دیگر کنه‌ها نظیر همافیزالیس پونکتاتا (۲۹)، ایکسودس پرسولکاتوس (۳) ایکسودس تری انگولیسپس و ریپی سفالوس سنگوئینوس نیز مطرح است (۵۰) با این حال، هنوز نادانسته‌های زیادی در خصوص اپیدمیولوژی بیماری وجود دارد. Cao و همکاران در (۲۰۰۶) در چین با آزمایش PCR ، ژن ۱۶S rRNA آناپلاسما فاگوسیتوفیلم را در کنه‌های ایکسودس پرسولکاتوس و درماسنتور سیلوارم تشخیص دادند (۶). Kim و همکاران (۲۰۰۳) در کره و Kawahara و همکاران (۲۰۰۶) در ژاپن ژن ۱۶S rRNA آناپلاسما فاگوسیتوفیلم را در کنه همافیزالیس لانگی کورنیس تشخیص دادند (۱۸، ۲۱). Keysary و همکاران (۲۰۰۷) در اسرائیل ژن ۱۶SrRNA آناپلاسما فاگوسیتوفیلم را در کنه‌های هیالوما مارجیناتوم، ریپی سفالوس تورانیکوس، بوئوفیلوس کلسی یافتند (۱۹). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پرندگان مهاجر نقش مهمی در پراکنش کنه‌های ناقل آلوده به آناپلاسما فاگوسیتوفیلم دارند (۴۳). با توجه به اینکه وجود آناپلاسما فاگوسیتوفیلم توسط محققین مختلف در کنه‌های جنس ایکسودس، ریپی سفالوس، همافیزالیس و هیالوما اثبات شده است و این کنه‌ها از فراوانی بالایی در دام‌های منطقه مازندران برخوردارند (۵۱) و با توجه به شناسایی ملکولی ژن ۱۶S rRNA آناپلاسما فاگوسیتوفیلم در گوسفندان مازندران، انتقال عامل بیماری توسط این گونه از کنه‌ها دور از ذهن نیست. لذا در تحقیقات آینده باید شناسایی این عامل در این کنه‌ها مد نظر قرار گیرد. علاوه با توجه به مهاجرت پرندگان از روسیه به شمال ایران و دریاچه خزر احتمال انتقال و پراکنش کنه‌های ناقل آناپلاسما فاگوسیتوفیلم به مناطق شمالی و مرکزی ایران وجود دارد که در این زمینه مطالعات و تحقیقات بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

در این تحقیق نیز درصد آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در بین گوسفندان و در سنین مختلف به ترتیب کمتر از ۱ سال (۵۰٪)، ۱-۳ سال (۲۷/۷٪)، ۳-۵ سال (۱۱/۱٪) و بالای ۵ سال (۰٪) می‌باشد (جدول۲). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p<۰/۰۵$). در تحقیقات Splitter و همکاران (۱۹۵۶) نیز این تفاوت معنی دار نبوده است (۴۶). به غیر سنین زیر ۱ سال و بالای ۵ سال، که تعداد نمونه غیر قایل توجه می‌باشد، آلودگی در سنین ۱-۳ سال بیشتر از ۳-۵ سال بوده است. در حالی‌که نتایج تحقیقات جلالی و همکاران (۲۰۱۳) موافق نتایج این تحقیق می‌باشد (۱۶)، تحقیقات محمد و همکاران (۲۰۱۶) از کشور عراق و همچنین Kocan و همکاران (۲۰۰۷) بر خلاف این امر بوده است (۲۲، ۳۰) اصولاً" در سنین پائین و کمتر از ۱ سال، بدلیل وجود آنتی بادی‌های مادری، آلودگی باید به مراتب کمتر از سنین بالا باشد. از طرفی، در سنین بالا بدلیل آبستنی‌های مکرر و احتمال همراهی بیشتر با حیوانات حامل وحساسیت بیشتر حیوانات، درصد آلودگی باید بیشتر باشد (۲۲). بهرحال این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

همچنین درصد آلودگی به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در این تحقیق بر حسب جنس نر و ماده به ترتیب (۴۰٪) و (۲۰٪) می‌باشد (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p<۰/۰۵$). این نتایج برخلاف نتایج بدست آمده از تحقیقات Kashif و همکاران(۲۰۱۴) در پاکستان می‌باشد، که در بررسی‌های خود، آلودگی به آناپلاسما را در گوسفندان ماده بیشتر از گوسفندان نر گزارش نمودند (۱۷). اصولاً" گوسفندان ماده به عنوان گوسفندان داشتی در گله مطرح بوده و به دلیل سن بالاتر و همچنین آبستنی‌های مکرر و احتمال همراهی با حیوانات حامل، باید از درصد آلودگی بیشتری نسبت به گوسفندان نر برخوردار باشند (۲۲).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در ارتفاعات مختلف، به ترتیب ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر (۲۱/۲٪)، ۵۰۰-۱۵۰۰ متر (۰٪) و بالای ۱۵۰۰ متر(۳۲٪) بدست آمده است (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p<۰/۰۵$). این نتایج با نتایج تحقیقات Lindgren و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت می‌نماید (۲۶). بهرحال در این تحقیق بدون در نظر گرفتن ارتفاع ۵۰۰-۱۵۰۰ متر که تعداد نمونه‌ها قابل توجه نمی‌باشد، در ارتفاع بالای ۱۵۰۰ متر درصد آلودگی بیشتر از ارتفاع پائین‌تر از ۵۰۰ متر می‌باشد. اصولاً" در ارتفاعات بالاتر فعالیت کنه‌ها بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس زیادتر می‌باشد (۸). این امر خود می‌تواند دلیل بر افزایش درصد آلودگی دام‌ها به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در این تحقیق باشد.

همچنین نتایج تحقیق حاکی از آن است که درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم درطول جغرافیائی۵۳- ۵۱ درجه، (۲۴/۲٪) و ۵۳ درجه (۰٪) می‌باشد. اگرچه با انجام آزمون کای اسکوئر، این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲) ولی در طول جغرافیائی۵۳-۵۱ درجه، درصدآلودگی بیشتر می‌باشد. شاید دلیل آن، پوشش جنگلی نسبتاً" بیشتر مناطق غربی استان مازندران نسبت به مناطق شرقی استان باشد، که خود سبب افزایش جمعیت و فعالیت بیشتر ناقلین عامل بیماری نظیر کنه‌ها و حشرات می‌گردد. تحقیقات انجام گرفته توسط واحدی و همکاران (۲۰۱۶) در ارتباط با فعالیت کنه‌های استان مازندران نیز این موضوع را تائید می‌نماید (۵۱).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم و نوع دامداری (سنتی-صنعتی)، درصد آلودگی به ترتیب در دامداری سنتی (۲۴/۴٪) و نیمه صنعتی(۱۵/۴٪) بدست آمده است (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این تفاوت نیز به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p<۰/۰۵$). با این حال درصد آلودگی در دامداری سنتی به مراتب بیشتر از دامداری نیمه صنعتی، می‌باشد. بهرحال رعایت برخی مسائل بهداشتی نظیر تعویض سرسوزن‌های مصرفی، استفاده بموقع از واکسن‌ها، داروها و رعایت بسیاری از مسائل بهداشتی در این زمینه می‌تواند موثر واقع گردد.

پ- بررسی شیوع آناپلاسما اوویس در گوسفندان

جهت تعیین گونه آناپلاسما اوویس، محصول PCR اولیه با جفت آغازگر

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاصی Anaplasma ovis sense و Anaplasma ovis Antisense برگرفته از ژن msp4 تکثیر شدند که در نتیجه آن ۵۶ نمونه (۵۸/۹٪) از ۹۵ نمونه اولیه به لحاظ آناپلاسما اوویس مثبت بوده و باند ۸۶۶bp تشکیل دادند (شکل ۳) (جدول ۱).

آناپلاسموزیس گاوی ایجاد شده بوسیله آناپلاسما مارجیناله یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاو در سراسر دنیا است و باعث ضررهای اقتصادی زیادی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌شود (۲۳، ۲۴) درحالی که آناپلاسما اوویس درگوسفندان اهلی باعث عوارض و بیماری می‌شود و این عامل برای گاو بیماری‌زا نیست (۷).

تشخیص آناپلاسما اوویس بطور معمول با در نظر گرفتن میزبان و با تشخیص گنجیدگی‌هایی که بطور حاشیه‌ای در گلبول‌های قرمز قرار گرفته‌اند انجام می‌شود (۲۷). رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی با گیمسا می‌تواند به عنوان روشی مناسب جهت تشخیص گونه‌های آناپلاسما در میزبان‌هایی که علائم حاد بیماری را نشان می‌دهند بکار گرفته شود، ولی این روش در تشخیص حیوانات حامل و حیواناتی که بیماری مزمن دارند کاربرد ندارد (۶).

آناپلاسما اوویس و آناپلاسما مارجیناله از نظر ریخت‌شناسی، بیولوژی، و انتقال از طریق کنه مشابه‌اند ولی در توانایی بیماری‌زایی در میزبان‌های اختصاصی متفاوت عمل می‌کنند. تلقیح آناپلاسما اوویس به گوساله‌های طحال‌برداری شده باعث گسترش عفونت و نشانه‌های بالینی نمی‌شود درصورتی که تلقیح آناپلاسما مارجیناله به گوسفندان طحال‌برداری شده باعث گسترش عفونت در گوسفند می‌شود، بنابراین آناپلاسما مارجیناله توانایی آلوده کردن گوسفند و گاو را دارد ولی آناپلاسما اوویس نمی‌تواند آلودگی پایدار در گاو ایجاد نماید (۳۳) بنابراین تفریق دو گونه آناپلاسما اوویس و آناپلاسما مارجیناله در گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. Lew و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، گنجیدگی‌های آناپلاسما اوویس و آناپلاسما مارجیناله در حاشیه گلبول‌های قرمز قرار می‌گیرند و علی رغم اختلاف در میزبان‌های اختصاصی این دو گونه، تفریق این دو گونه با روش میکروسکوپی در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده غیر ممکن است (۲۵). de la Fuente و همکاران (۲۰۰۵) در تجزیه توالی‌های نوکلئوتیدی ژنmsp4 آناپلاسما اوویس نشان دادند که این ژن در گوسفند و دیگر نشخوارکنندگان کوچک و نقاط جغرافیایی مختلف دارای تفاوت‌هایی است که از این ژن می‌توان در تشخیص ایزوله‌های جغرافیایی مختلف استفاده نمود (۹). در این تحقیق بر اساس ژن msp4، ۵۶ نمونه (۵۸/۹٪) از ۹۵ نمونه خون گوسفندی درآزمایش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آناپلاسما اوویس تکثیر و باند ۸۶۶bp تشکیل دادند(جدول ۱). لذا میزان آلودگی گوسفندان منطقه به آناپلاسما اوویس نسبتا" بالا است. در بررسی انجام شده توسط نعمان و همکاران (۲۰۱۰) در گوسفندان استان اصفهان بر اساس ژن ۱۶S rRNA مشخص شد که ۳۳٪ از نمونه‌ها درآزمایش PCR-RFLP مثبت بودند. در تحقیق فوق‌الذکر نشانه‌های بالینی در گوسفندانی که مثبت بودند ثبت نشد و در بررسی اسمیرهای خونی این دام‌ها هیچگونه گنجیدگی در نوتروفیل‌ها مشاهده نگردید که نشانه حامل بودن دام‌های مورد نمونه‌گیری بوده است. نتیجه این تحقیق با تحقیق انجام گرفته همخوانی دارد(۳۳). همچنین. نعمان (۲۰۱۲) در شناسایی کنه‌های گوسفندان آلوده به آناپلاسما اوویس در مرکز ایران کنه ریپی سفالوس سانگوئینوس را به عنوان ناقل عامل بیماری مطرح کرد (۳۴). با توجه به فعالیت بالای کنه‌های سخت در جمعیت گوسفندان استان مازندران، بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس، ریپی سفالوس و هیالوما (۵۱)، لذا ثبت درصد بالای آلودگی گوسفندان به باکتری آناپلاسما اوویس در منطقه دور از انتظار نمی‌باشد.

با توجه به (جدول ۳)، درصد آلودگی آناپلاسما اوویس در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار (۴۰/۹٪)، تابستان (۲۱/۵٪)، پائیز (۵۴/۵٪) و زمستان (۷۹/۱٪) می‌باشد. با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). بهرحال این نتیجه برخلاف درصد آلودگی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم دراین تحقیق می‌باشد. با توجه به اینکه در استان مازندران، زمستان فصل فعالیت کنه ایکسودس رسینوس می‌باشد (۵۱)، و اگر کنه جنس ایکسودس را به عنوان ناقل عمده آناپلاسما اوویس بحساب آوریم، لذا افزایش درصد آلودگی در فصل زمستان قابل پیش‌بینی است. البته انتظار می‌رود که در آینده، تحقیقات در راستای شناسائی آلودگی کنه‌ها ی سخت رایج در منطقه به باکتری آناپلاسما متمرکز گردد.

همچنین درصد آلودگی آناپلاسما اوویس دربین گوسفندان و در سنین مختلف به ترتیب کمتر از ۱ سال (۰٪)، ۱-۳ سال (۵۸/۵٪)، ۳-۵ سال (۶۶/۶٪) و بالای ۵ سال (۰٪) می‌باشد (جدول۳). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p<0/05$). اگرچه در سن بالای ۵ سال درصد آلودگی (۰٪) بوده است، اما نتایج حاکی از آن است که با افزایش سن، درصد آلودگی افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که بروز نشانی‌های بالینی ناشی از آلودگی به آناپلاسما اوویس در گوسفندان با سن دام مرتبط می‌باشد (۴)، ولی افزایش میزان آلودگی در ارتباط با سن می‌تواند ناشی از افزایش احتمال مواجهه با عامل بیماری در مراتع باشد (۲۲).

بر اساس نتایج این تحقیق، بین درصد آلودگی به آناپلاسما اوویس در جنس نر وماده به ترتیب (۳۳/۳٪) و(۶۳/۸٪) است. با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). (جدول ۳). احتمالا" با توجه به اینکه، جنس ماده به عنوان گوسفندان داشتی مطرح می‌باشند و همچنین بواسطه آبستنی‌های مکرر و حضور سالیانی بیشتر در گله ، لذا احتمال درگیری و مواجهه با عامل عفونی در آنها بیشتر از جنس نر می‌باشد (۲۲).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما اوویس در ارتفاعات مختلف، به ترتیب ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر (۵۹/۱ ٪)، ۵۰۰-۱۵۰۰ متر (۰ ٪) و بالای ۱۵۰۰ متر(۶۸ ٪) بدست آمده است (جدول ۳). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). در ارتفاع بالای ۱۵۰۰ متر درصد آلودگی بیشتر از ارتفاع پائین‌تر از ۵۰۰ متر می‌باشد. اصولا" در ارتفاعات بالاتر فعالیت کنه‌ها بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس زیادتر می‌باشد (۸). این امر خود می‌تواند دلیل بر افزایش درصد آلودگی دام‌ها به آناپلاسما اوویس در این تحقیق باشد.البته این امر نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه دارد.

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان به آناپلاسما اوویس در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه (۶۳/۵٪) و ۵۳ درجه (۰٪)، است. با انجام

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). (جدول۳). اگرچه شرایط جغرافیایی در شیوه آلودگی به آناپلاسما اوویس نقش مهمی دارد (۴۴)، اما شاید دلیل مهم این امر پوشش جنگلی نسبتا" زیاد مناطق غرب استان، نسبت به مناطق شرقی استان باشد که بدنبال آن سبب افزایش فعالیت کنه‌ها و حشرات حامل باکتری آناپلاسما می‌گردند. تحقیقات انجام گرفته توسط واحدی و همکاران (۲۰۱۶) در ارتباط با فعالیت کنه‌های استان مازندران نیز این موضوع را تائید می‌نماید (۵۱).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلاسما اوویس و نوع دامداری(سنتی- نیمه صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۶۰/۱ ٪) و نیمه صنعتی (۴۶/۲ ٪) بدست آمده است (جدول۳). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p<۰/۰۵). با این حال درصد آلودگی دردامداری سنتی به مراتب بیشتر از دامداری نیمه صنعتی، می‌باشد. رعایت برخی مسائل بهداشتی نظیر تعویض سر سوزن‌های مصرفی، استفاده بموقع از واکسن‌ها، داروها و رعایت بسیاری از مسائل بهداشتی در این زمینه می‌تواند موثر واقع گردد.

در پایان لازم به ذکر است، که با توجه به اهمیت آلودگی گونه‌های مختلف آناپلاسما در دام‌ها و همچنین امکان آلودگی انسان با گونه‌های شناسائی شده تحقیقات گسترده در این زمینه و بررسی میزبانان واسط و مخزن آن‌ها، در استان مازندران صورت پذیرد.

منابع مورد استفاده

1) 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 J. Vet. Res*., Shiraz University. 10: 367- 372.

2) Alberti, A., Addis, M.F., Sparagano, O., Zobba, R., Chessa, B., Cubeddu, T., Parpaglia, M.L.P., Ardu, M., Pittau, M (2005) *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1322–1323.

3) Alekseev A., Dubinina H. and Schouls L (1998) First detection of Ehrlichia infected ticks among the primary vectors of the tick-borne encephalitis and borreliosis in the Russian Baltic region. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology*, 8: 88–91.

4) Ameen, K.A.H.; Abdullah, B.A. and Abdul-Razaq, R.A (2013) Seroprevalence of Babesia bigemina and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 26, Supplement III, (109-114) Proceedings of the 6 th Scientific Conference, College of Veterinary Medicine, University of Mosul.

5) Bashiribod, H (2004) First Molecular Detection of *Anaplnsmn phagocytophilum* in Ixodes ricinus Ticks in Iran. *J. Med. Sci*,4(4), 282-286.

6) Cao, W. C., Zhan, L., He, J., Foley, J. E., De Vlas, S. J., G wu, X.M., Yang, H.,Richardus, J. H., Habbema, J. DIK F (2006) Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(4):664–668.

7) Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C (2007) Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet Microbiol.* 124:107-104.

8) Daniel M, Danielova V, Kriz B, Jirsa A, Nozicka J (2003) Shift of the tick Ixodes ricinus and tick-borne encephalitis to higher altitudes in Central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2003, 22:327-328

9) 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. *Anim Health Res Rev* 6: 75–89.

10) Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisia Y., Rurangirwa F.R (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: uni¬fication of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorick¬ettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145–2165.

11) Eriks, I.S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R., Barbet, A.F (1989) Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *J Clin Microbiol*. 27(2):279-84.

12) Goethert, H. K. & Telford, S. R (2003) Enzootic Transmission of *Anaplasma bovis* in Nantucket Cottontail Rabbits. *Journal of Clinical Microbiology,* 41: 3744-3747.

13) Grøva L., Olesen I., Steinshamn H., Stuen S(2011) Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53:30.

14) Hosseini -Vasoukolaei, N., Telmadarraiy, Z., Vatandoost, H., Yaghoobi Ershadi, M .R. Hosseini - asoukolaei, M. and Oshaghi, MA (2010) Survey of Tick Species Parasiting Domestic Ruminants in Ghaemshahr County, Mazandaran Province, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* ,3, 804 -806.

15) Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., Brouqui, P (2001) Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8: 241-242.

www.SID.ir

Archive of SID

16) Jalali, S. M.; Khaki, Z.; Kazemi, B.; Bandehpour, M.; Rahbari, S.; Razi Jalali, M. and Yasini, S. P. (2013) Molecular detection and identification of Anaplasma species in sheep from Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research,* Shiraz University, 14: 50-56.

17) Kashif M., Ahmad M S., Ahmad G., Fareed I ., Shah S T (2014) Seroprevalence of Anaplasma sp. in Sheep (*Ovis aries*) by ELISA in Peshawar, Pakistan. *International Journal of Current Research* 6: 4502-4504.

18) Kawahara, M., Rikihisa, Y., Lin, Q., Isogai, E., Tahara, K., Itagaki, A.,Hiramitsu, Y., Tajima, T (2006) Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma bovis, Anaplasma centrale*, and a *novel Ehrlichia sp.* in Wild Deer and Ticks on Two Major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol*. 72: 1102–1109.

19) Keysary, A., Massung, R.F., Inbar, M., Wallach, A.D., Shanas, U., Mumcuoglu, K.Y., Waner, T (2007) Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in Israel. *Emerg Infect Dis.* 13:1411-2.

20) Kieser, S. T., Eriks, I. E., Palmer, G. H (1990) cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Infect. Immun.* 58:1117-1119.

21) Kim, C.M., Kim, M.S., Park, M.S., Park, J.H., Chae, J.S (2003) Identification of Ehrlichia chaffeensis, *Anaplasma phagocytophilum,* and A. bovis in Haemaphysalis longicornis and Ixodes persulcatus ticks from Korea. *Vect. Born. Zoon. Dis*. 3: 17–26.

22) Kocan, K. M., DE LA Fuente, J.; Blouin, E. F. and Garcia-Garcia, J. C (2007) *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Department of Veterinary Pathobiology, 250 McElroy Hall, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078-USA.

23) Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmone, A. A., Meléndez, R. D (2003) Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews,* 16, 4:698-712.

24) Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Garcia-Garcia, C (2002) Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale,* for survival in cattle and ticks. *Experimental and Applied Acarology* 28: 9–25.

25) Lew, A. F., Gale, K. R., Minchin, C. M., Shkap, V., de Waal, V (2003) Phylogenetic analysis of the erythrocytic Anaplasma species based on 16S rDNA and GroEl (HSP60) sequences of A. marginale, A. centrale, and A. ovis and the specific detection of A. centrale vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 20:145-160.

26) Lindgren E, Talleklint L, Polfeldt T (2000) Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick Ixodes ricinus. *Environmental Health Perspectives* 2000, 108:119-123.

27) 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* 107:145–148.

28) Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M (2000) PCR detection of granulocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1002–1007.

29) MacLeod, J., (1962). Ticks and disease in domestic stocks in Great Britain. *Symposium of the Zoological Society of London*, 6: 29–50.

30) Mohammed A H., Salman K O (2016) Epidemiological and Hematological Studies of Anaplasma SPP. in Sheep in Middle Parts of Iraq , *Bas.J.Vet.Res.*1: 277

31) 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. *Vet Microbiol.* 113(1-2):55-62.

32) Noaman, V., Shayan, P (2009) Comparison of Microscopic methods and PCR-RFLP for detection of Anaplasma marginale in carrier cattle. *Iranian Journal of Microbiology*. 2: 89-94.

33) Noaman, V., Shayan, P. Shahmoradi, A.H (2010) Detection of Anaplasma ovis based on 16S rRNA gene by PCR-RFLP in sheep from central part of Iran. *Journal of Veterinary Medicine & Laboratory*.1: 27-37.

34) Noaman, V (2012) Identification of hard ticks collected from sheep naturally infected with *Anaplasma ovis* in Isfahan province, central Iran. *Comp Clin Pathol*. 21: 367–369

35) Noaman, V., & Bastani, D (2016) Molecular study on infection rates of *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale* in sheep and cattle in West-Azerbaijan province, Iran. *Veterinary Research Forum*. 7: 163–167

36) Noaman, V., Nabinejad, A., Shahmoradi, A., & Esmaeilkhanian, S (2016) Molecular detection of bovine leukocytic Anaplasma species in Isfahan, Iran. *Research in Molecular Medicine,* 4, 47-51.

37) Noaman, V., Allameh, S. K., & Nabavi, R (2017) Anaplasmosis in Ruminants of Iran: An overview. *Adv Tech Clin Microbiol*, 1: 13-16.

38) Noaman, V (2019) A review on *Anaplasma phagocytophilum* as a zoonotic agent. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*, 76: 778-785.

39) Razmi, G. R., K. Dastjerdi, H. Hossieni, A. Naghibi, F. Barati, and M. R. Aslani) 2006 (An Epidemiological Study on Anaplasma

www.SID.ir

Archive of SID

infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburu, Khorasan Province, Iran. *Ann. N.Y Acad. Sci.* 1078, 479–481.

40) RIKIHISA,Y.; EWING, S.A.; FOX, J.C et al (1991) Analyses of Ehrlichia canis and a canine granulocitic Ehrlichia infection. J. Clin. Microbiol, v.30, p.143-148, 1991.

41) Rymaszewska, A. & Grenda, S (2008a) Bacteria of the genus Anaplasma-characteristics of Anaplasma and their vectors: a review. *Vet Med*, 53(11), pp 573–584.

42) Sainz, A., Amusategui, I. & Tesouro, M. A (1999) Ehrlichia Platys Infection and Disease in Dogs in Spain. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11(4), pp 382–384.

43) Salmon, D. E., Smith, T (1896) Infectious diseases of cattle: southern cattle fever (Texas fever), p. 428-438. In Special report on diseases of cattle and on cattle feeding. USDA Bureau of Animal Industry. Government Printing Office, Washington.

44) Shompole S., Waghela S.D., and Rurangirwa F.R., McGuire T (1989) Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal a high prevalence of infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2730–2735.

45) Spitalska E, Namavari MM, Hosseini MH, Shad-del F, Amrabad OR, Sparagano OAE (2005) Molecular surveillance of tick-borne diseases in Iranian small ruminants. *Small Rum Res* 57:245–248.

46) Splitter, E. J., Anthony, H. D. & Twiehaus, M. J (1956) *Anaplasma ovis* in the United States: experimental studies with sheep and goats. American Journal of Veterinary Research, (17), pp 487–491.

47) Strle F (2004) Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology,* 293, S37:27–35.

48) Stuen, S (2007) naplasma phagocytophilum-the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, 31: 79–84.

49) Stuen S, Bergstrom K (2001)Serological investigation of granulocytic Ehrlichia infection in sheep in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42:331-338.

50) Torina, A., Caracappa, S (2007) Anaplasmosis in cattle in Italy. *Veterinary Research Communications*, 31: 73–78.

51) Vahedi Noori, N, Abdi Goodarzi, M. Mohammad Nejad Kiasari, Sh (2016) Evaluation of the species diversity and abundance of hard ticks (Family: Ixodidae) parasite of cattle and sheep in Mazandaran province. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)* 106: 58

52) Yousefi, A., Rahbari, S., Shayan, P., Sadeghi-dehkordi, Z., & Bahonar, A (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.

www.SID.ir