

شناسائی ملکولی گونه‌های بیماریزای آناپلازما در گوسفندان استان مازندران

• نصرالله واحدی نوری (نویسنده مسئول)

استادیار، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• وحید نعمان

دانشیار، بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۲-۰۸

Email: nsvahedi@yahoo.com



چکیده

هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های آناپلازما در گوسفندان استان مازندران بود. برای این منظور تعداد ۹۵ نمونه خون از طریق رگ وداچ 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 آناپلازما 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 آناپلازما را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. ۷۰ نمونه (۷۳/۷٪) از ۹۵ نمونه اخذ شده در اولین PCR و nested-PCR از نظر جنس آناپلازما مثبت شدند. تمامی نمونه‌های مثبت با nested-PCR اختصاصی از نظر وجود آناپلازما فاگوسیتوفیلیم بررسی شدند و ۲۲ نمونه (۲۳/۲٪) از نظر آناپلازما فاگوسیتوفیلیم مثبت تشخیص داده شد. DNA استخراجی نمونه‌های مثبت با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که قطعه ۸۶۶ جفت بازی از ژن msp4 آناپلازما اوویس را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. ۵۶ نمونه (۵۸/۹٪) از ۹۵ نمونه از نظر آناپلازما اوویس مثبت بودند. این مطالعه اولین تشخیص ملکولی گونه‌های آناپلازما در گوسفندان در استان مازندران است. نتایج نشان می‌دهد که در بین درصد آلودگی گوسفندان به آناپلازما فاگوسیتوفیلوم، در فصول مختلف سال اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$). همچنین از نظر آلودگی به آناپلازما اوویس، از میان متغیرهای مورد بررسی، بین فصول مختلف، ارتفاع از سطح دریا، جنس و طول جغرافیائی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$).

کلمات کلیدی: ملکولی، گونه‌های آناپلازما، گوسفندان، مازندران

• 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

آمبلیوما می باشد (۲۸). آناپلاسموزیس، ناشی از آناپلازما اوویس، یکی از گسترده ترین بیماری های 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، گونه های کنه و میزبان مخزن ممکن است با حضور و فراوانی آناپلازما اوویس در مناطق مختلف در ارتباط باشد. در ایران آلودگی با آناپلازما اوویس در نشخوارکنندگان کوچک به روش های رنگ آمیزی و ملکولی از استان های خراسان رضوی، اصفهان، مازندران، آذربایجان غربی و خوزستان گزارش شده است (۱۴، ۱۶، ۳۳، ۳۵، ۳۹).

آنپلازما فاگوسیتوفیلیم که قبلاً تحت عنوان ارلیشیا فاگوسیتوفیلا نامیده می شد ممکن است در بسیاری از حیوانات و انسان ایجاد بیماری کند. تظاهرات بالینی ناشی از این عامل بیماری زا در گوسفند، بز، گاو، اسب، سگ، گربه، گوزن و انسان گزارش شده است. بیماری در نشخوارکنندگان به نام تب ناشی از کنه نیز نامیده می شود. این بیماری در گاو و گوسفند با تب بالا، کاهش تولید شیر، وجود گنجدگی در نوتروفیل های محیطی، لوکوپنی، سقط و کاهش باروری دیده می شود. در گاو و گوسفند، دوره انکوباسیون بیماری ۴-۹ روز و دوره تب از ۱ تا ۱۳ روز متغیر است و

مقدمه

باکتری جنس آناپلازما، متعلق به سلسله پروکاریوت ها، راسته ریکتزیاله و خانواده آناپلاسماتسه آ می باشد (۱۰). جنس آناپلازما شامل باکتری های ریز، گرم منفی می باشد که بطور اختصاصی در داخل سیتوپلاسم سلول های خونی (نوتروفیل، ماکروفاژها، منوسیت و گلبول های قرمز خون) و یا در بافت پوششی رگ های خونی میزبان های مختلف بسر می برند (۱۲). این جنس از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت است. اگرچه در محیط هایی که این باکتری ها برای سال های متوالی حضور فعال داشته و تکثیر می نماید، بسیاری از مهره داران به عنوان مخزن آن عمل می نمایند، اما در موارد زیادی، گونه های جنس آناپلازما در حیوانات اهلی و انسان سبب بیماری می گردند (۴۲). گونه های آناپلازما مارچیناله، اوویس و سنتراله، گلبول های قرمز نشخوارکنندگان و گونه آناپلازما فاگوسیتوفیلوم که به گرانولوسیت ها حمله می نماید، برای انواع حیوان اهلی و وحشی و همچنین انسان بیماری زا می باشد (۴۱). یک بخش مهم در چرخه زندگی این باکتری ها، ناقلین می باشند که در انتشار آنها در محیط نقش بسزائی دارند. اصلی ترین ناقلین باکتری آناپلازما در نقاط مختلف دنیا، کنه های سخت شامل جنس های: ایکسودس، ریپی سفالوس، درماستور و

۳ cm ۱/۵ 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 آناپلازما بدون در نظر داشتن گونه خاصی انجام گرفت. بدین منظور از جفت آغازگر Anaplasma all استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن در تمامی گونه‌های آناپلازما 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 rRNA ۱۶S جنس آناپلازما 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 (Cinna Gen ۱۰۰bp plus DNA Ladder) ساخت شرکت Cinna Gen در ژل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت این ژل را بمدت ۲۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید قرار داده و پس از رنگ‌آمیزی نتیجه با دستگاه UV مشاهده و عکس‌برداری انجام گرفت.

Nested PCR

جهت تأیید 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 آناپلازما را تکثیر نمی‌کرد و جنس آناپلازما را تشخیص می‌داد ولی به جهت تأیید تشخیص DNA تکثیری در محصول اولیه و اطمینان از عدم تکثیر DNA ارگانسیم‌های 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 rRNA ۱۶S نیز تکثیر می‌شود. بنابر این از قطعه مذکور نیز می‌توان در جهت تشخیص گونه استفاده نمود. بعد از اتمام PCR نمونه‌ها در داخل گوده‌های ژل آگاروز (۱/۵٪ در محلول TBE ۰.۵x) قرار داده شده، در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول TBE ۰.۵x و با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شد. مارکر سبک CinnaGen ۱۰۰bp 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 باندهای با وزن ۳۴۵ bp، نمونه مثبت تلقی و صحت PCR اولیه تأیید می‌شود.

Nested PCR جهت تشخیص گونه آناپلازما فاگوسیتوفیلیم

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

'Forward strand primer: 5'GTGCAACGGATTATCTTTATAGCTTGC 3

علامت درمانگاهی به صورت 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 آناپلازما فاگوسیتوفیلیم در اکثر کشورهای دنیا گزارش شده است (۳۷، ۳۸) در ایران عامل بیماری در گاو، نشخوارکنندگان کوچک و کهنه 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 بندیا، شاهد ظهور این بیماری می‌باشیم که خسارات جبران ناپذیری را به دامداران تحمیل می‌کند. آزمایش میکروسکوپی اسلایدهای خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا تنها می‌تواند جهت تأیید آناپلاسموزیس حاد بکار گرفته شود و جهت شناسایی دام‌هایی که عفونت پایدار دارند و بعنوان مخزن برای انتقال در گله محسوب می‌شوند، قابل استفاده نیست (۳۲). در ضمن تشخیص و تفریق سروژنیک گونه‌های آناپلازما به علت واکنش‌های متقاطع بین گونه‌های امکان پذیر نمی‌باشد و این روش‌ها فاقد حساسیت و ویژگی قابل اعتماد نسبت به آزمایش‌های مولکولی می‌باشند. علی‌رغم تحقیقاتی که تاکنون در ایران بر روی شناسایی گونه‌های آناپلازما در ایران صورت گرفته است، با این وجود، تحقیقات در زمینه شناسایی مولکولی گونه‌های بیماری‌زا و رایج آناپلازما در کشور عوامل موثر بر آن محدود بوده و عمده گزارش‌ها بر مبنای شناسایی میکروسکوپی می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر، ارائه بیشتر اطلاعات در زمینه گونه‌های بیماری‌زای آناپلازما و شناسایی 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 بر روی 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 وداچ 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 شناسایی مولکولی آناپلازما 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

جهت تأیید 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 آناپلازما مثبت بودند (جدول ۱).

جهت تعیین گونه آناپلازما فاگوسیتوفیلوم، 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 آناپلازما 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 ۸۶۶ bp مشاهده شد (شکل ۳).

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

از ۹۵ راس گوسفند مورد بررسی، ۲۲ راس (۲۳/۲٪) آلوده به باکتری آناپلازما فاگوسیتوفیلوم بودند (جدول ۱). بر اساس (جدول ۲)، درصد آلودگی آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در فصول مختلف سال، به ترتیب بهار (۱۸/۲٪)، تابستان (۵۷/۲٪)، پاییز (۱۸/۲٪) و زمستان (۱۶/۷٪) می‌باشد.

در مقایسه فراوانی گونه آناپلازما 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 آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در بین گوسفندان و در سنین مختلف به ترتیب کمتر از ۱ سال (۵۰٪)، ۱ الی ۳ سال (۲۷/۷٪)، ۳ - ۵ سال (۱۱/۱٪) و بالای ۵ سال (۰٪) می‌باشد (جدول ۲). در مقایسه فراوانی گونه آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در سنین مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۲).

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 ۲۰ μl و بر اساس دستورالعمل تهیه گردید. بعد از آماده سازی محلولها در تیوب اپندورف ۲۰۰ μl، 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 آناپلازما فاگوسیتوفیلوم تکثیر می‌شد، بانندی در حدود ۹۲۶ bp روی ژل مشاهده می‌گردید و گونه آناپلازما در رابطه با آغازگری که واکنش داشت، تعیین می‌گردید.

PCR جهت تکثیر گونه های آناپلازما اوویس با استفاده از ژن msp4
برای این منظور آغازگرهای اختصاصی طراحی شد که بتواند فقط ژن msp4 گونه آناپلازما اوویس را در خون گوسفند تکثیر نماید. محصول مورد انتظار حاصل از تکثیر این دو آغازگر بانندی 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 آناپلازما اوویس تکثیر می‌شد، بانندی در حدود ۸۶۶ bp روی ژل مشاهده می‌گردید و گونه آناپلازما 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 شناسایی شده آناپلازما اوویس در مقایسه درصد آلودگی هر یک از آنها در فصول مختلف سال، سنین مختلف، جنس دام، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایی و نوع دامداری استفاده شد.

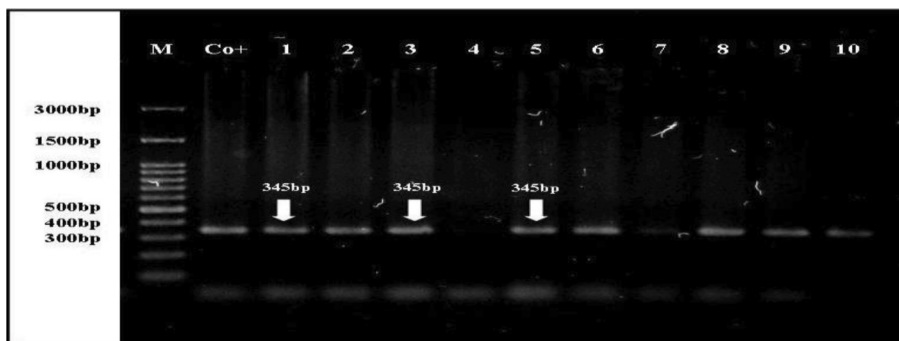
نتایج

الف: شناسایی گونه‌های آناپلازما در گوسفندان

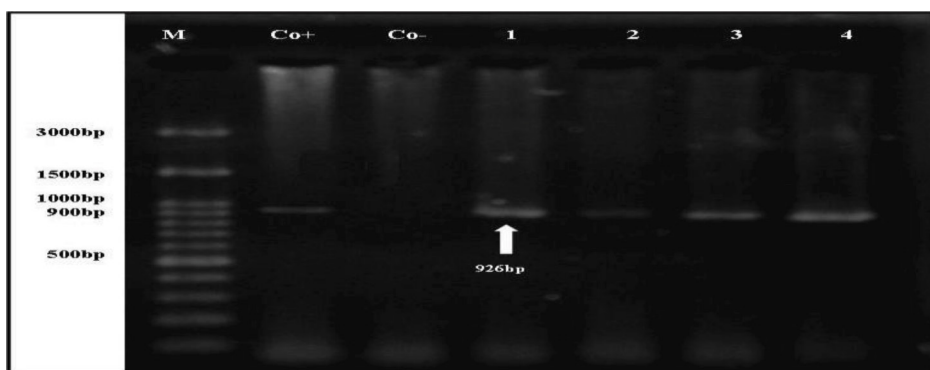
بر اساس روش کار، بدنال استخراج DNA و انجام PCR اولیه و سپس

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

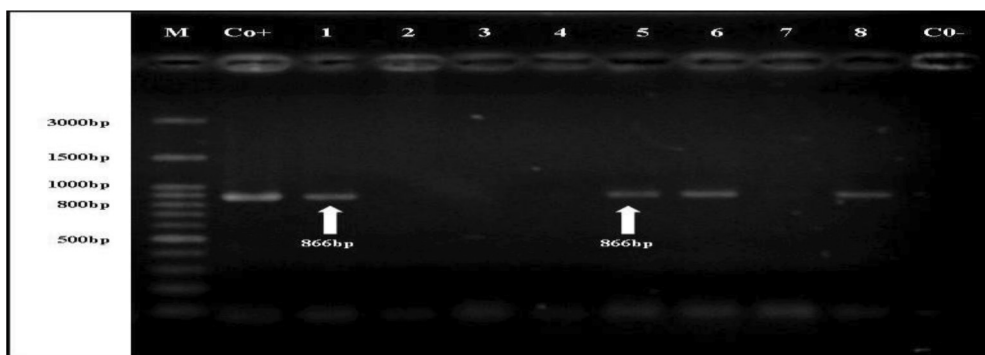
نوع دام	گونه های آناپلازما	تعداد مورد بررسی	فراوانی آلودگی	درصد	حدود اطمینان ۹۵٪	
					کمترین	بیشترین
گوسفند	آنپلازما	۹۵	۷۰	۷۳/۷٪	۶۴٪	۸۱/۵٪
	آنپلازما فاگوسیتوفیلوم	۹۵	۲۲	۲۳/۲٪	۴۸/۹٪	۳۲/۶٪
	آنپلازما اوویس	۹۵	۵۶	۵۸/۹٪	۱۵/۸٪	۶۸/۳٪



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 - *Anaplasma phagocytophilum* (تکثیر شده با پرایمر اختصاصی) ۹۲۶ bp



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

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 آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، درصد آلودگی گوسفندان به آنپلاسما اوویس در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه (۶۳/۵٪) و ۵۳ درجه (۰٪) می‌باشد (جدول ۳). در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در طول جغرافیائی مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آنپلاسما 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 آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

بحث

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

الف: شناسائی گونه‌های آنپلاسما 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 آنپلاسما 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 آنپلاسما مثبت بودند (۱). در بررسی دیگر که توسط اسپیتالسکا و همکاران (۲۰۰۵) بر روی گوسفندان استان فارس (شیراز) انجام شد، میزان شیوع آنپلاسما به روش مولکولی و تکثیر قطعه ژن ۱۶SrRNA، ۲۹٪ برآورد گردید (۴۵). جلالی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی‌های خود بر روی گوسفندان منطقه اهواز، نیز با روش مولکولی و تکثیر قطعه ژنی ۱۶SrRNA، میزان شیوع آنپلاسما را در ۸۷/۴٪ تعیین نمودند (۱۶).

بر اساس روش کار، نمونه‌گیری از گوسفندانی بعمل آمده است که فاقد هر گونه علائم بالینی آنپلاسموزیس بودند. اگرچه آنپلاسموزیس گاوی بیماری مهمی است که باعث ضررهای زیادی به صنعت گاوداری می‌گردد، آنپلاسموزیس گوسفندی معمولاً باعث بیماری شدید نمی‌شود و تنها در برخی از موارد، گوسفندان در معرض استرس یا عوامل مساعدکننده، نشانه‌های بالینی آنپلاسموزیس را نشان می‌دهند. بهر حال دام‌هایی که به نحوی با گونه‌های آنپلاسما 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، درصد آلودگی گوسفندان در این تحقیق (۷۳/۷٪) تعیین گردیده است که

درصد آلودگی به آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در این تحقیق بر حسب جنس نر و ماده به ترتیب (۴۰٪) و (۲۰٪) می‌باشد (جدول ۲). در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۲).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آنپلاسما 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). در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در ارتفاعات مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۲). همچنین نتایج نشان می‌دهد، درصد آلودگی گوسفندان به آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه (۲۴/۲٪) و بیشتر از ۵۳ درجه (۰٪) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در طول جغرافیائی مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۲).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آنپلاسما 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 آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان استان مازندران در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۲).

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

از ۹۵ راس گوسفند مورد بررسی، ۵۶ راس (۵۸/۹٪) آلوده به باکتری آنپلاسما اوویس بودند (جدول ۱). بر اساس نتایج بدست آمده (جدول ۳)، درصد آلودگی آنپلاسما اوویس در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار (۴۰/۹٪)، تابستان (۲۱/۵٪)، پاییز (۵۴/۵٪) و زمستان (۷۹/۱٪) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در فصول مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

همچنین درصد آلودگی آنپلاسما اوویس در بین 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 (جدول ۳). در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در سنین مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

در این تحقیق، درصد آلودگی به آنپلاسما اوویس بر حسب جنس نر و ماده به ترتیب (۳۳/۳٪) و (۶۳/۸٪) می‌باشد (جدول ۳). در مقایسه فراوانی گونه آنپلاسما اوویس در گوسفندان استان مازندران در جنس‌های مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.05$) (جدول ۳).

در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آنپلاسما اوویس

روش استاندارد طلایی در تشخیص گونه‌های آناپلازما به شمار می‌آید (۴۱) روش مولکولی توانایی تشخیص کمتر از ۵۰-۱۰ گلبول قرمز یا سفید آلوده به آناپلازما را در میلی لیتر خون دارد (۱۵، ۳۱).

ب: بررسی شیوع آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان

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

درصد بالائی می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک خطر جدی برای جمعیت دامی و حتی انسانی نیز در استان بحساب آید. از طرف دیگر میزان میکروارگانیسم در خون دام‌های حامل آناپلازما بسیار پائین می‌باشد، بنابراین تشخیص آناپلازما در دام‌های حامل بطریق میکروسکوپی 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 آناپلازمایی از ذرات رنگ، اجسام هاول ژولی و اجسام هینز نیست (۴۹). Kieser و همکاران (۱۹۹۰) اعلام کردند آلودگی کمتر از ۱/۰٪ گلبول‌های قرمز در گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده، قابل تشخیص نمی‌باشد (۲۰). بنابراین با توجه به معایب روش‌های میکروسکوپی و سرولوژی، بهترین روش تشخیص، روش تشخیص ملکولی آناپلازما بر اساس PCR در دام‌های حامل می‌باشد و این روش در حال حاضر به عنوان

جدول ۲- رابطه آلودگی گوسفندان مازندران به آناپلازما فاگوسیتوفیلوم و متغیرهای مورد بررسی*

متغیر	آنپلازما فاگوسیتوفیلوم (مثبت)		آنپلازما 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	۵۳° - ۵۱°	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)

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 آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در فصل تابستان، بیشتر از سایر فصول می‌باشد (۵۷/۲٪) (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). با توجه به اینکه انتقال و شیوع آلودگی آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در میان دام‌ها بستگی به فعالیت کنه‌ها 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 آناپلازما سموز در دام‌های ایتالیا، عنوان می‌کند آناپلازما فاگوسیتوفیلوم نسبت به آناپلازما مارجیناله طیف وسیع‌تری از میزبان‌ها

نشده و این تحقیق اولین گزارش تشخیص ملکولی آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در گوسفندان مازندران می‌باشد. در بررسی گروا و همکاران (۲۰۱۱) در نورژ بر روی بره‌ها، میزان آلودگی ۵۵٪ تعیین گردید (۱۳). آناپلازما فاگوسیتوفیلوم که قبلاً تحت عنوان اریلیشیا 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. در گاو و گوسفند، دوره انکوباسیون بیماری ۴-۹ روز و دوره تب از ۱ تا ۱۳ روز متغیر است و علائم درمانگاهی بصورت خفیف تا متوسط بروز می‌کند و به ندرت

جدول ۲- رابطه آلودگی گوسفندان مازندران به آناپلازما اوویس و متغیرهای مورد بررسی *

متغیر	آنپلازما اوویس (مثبت)		آنپلازما 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	۲۸	۷۹/۱٪	۱۰	۲۰/۹٪			
سن	< ۱ سال	۰	۰٪	۲	۱۰۰٪	۴/۹۷۹	۳	۰/۱۷۳
	۱-۳ سال	۲۸	۵۸/۵٪	۲۷	۴۱/۵٪			
	۳-۵ سال	۱۸	۶۶/۶٪	۹	۳۳/۴٪			
	> ۵ سال	۰	۰٪	۱	۱۰۰٪			
جنس	نر	۵	۲۳/۳٪	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 جغرافیایی	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٪			

* ($p < 0.05$)

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 آنپلاسما 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 ($p < 0.05$). این نتایج برخلاف نتایج بدست آمده از تحقیقات Kashif و همکاران (۲۰۱۴) در پاکستان می‌باشد، که در بررسی‌های خود، آلودگی به آنپلاسما را در گوسفندان ماده بیشتر از گوسفندان نر گزارش نمودند (۱۷). اصولاً گوسفندان ماده به عنوان گوسفندان داشتنی 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 آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در ارتفاعات مختلف، به ترتیب ارتفاع کمتر از ۵۰۰ متر (۲۱/۲٪)، ۵۰۰-۱۵۰۰ متر (۲۰٪) و بالای ۱۵۰۰ متر (۳۲٪) بدست آمده است (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p < 0.05$). 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 آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در این تحقیق باشد. همچنین نتایج تحقیق حاکی از آن است که درصد آلودگی گوسفندان به آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه، (۲۴/۲٪) و ۵۳ درجه (۲۰٪) می‌باشد. اگرچه با انجام آزمون کای اسکور، این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ($p < 0.05$) (جدول ۲) ولی در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه، درصد آلودگی 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 تأیید می‌نماید (۵۱).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آنپلاسما 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 ($p < 0.05$). 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 موقوع از واکسن‌ها، داروها و رعایت بسیاری از مسائل بهداشتی در این زمینه می‌تواند موثر واقع گردد.

پ- بررسی شیوع آنپلاسما اوویس در گوسفندان

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

و مکان‌های جغرافیایی را در بر می‌گیرد و علاوه بر کنه ایکسودس رسیوس، جنس‌های دیگر کنه نیز ناقل این عامل می‌باشند (۵۰). آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم 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 رسیوس و در شرق اروپا و آسیا ایکسودس پرسولکاتوس می‌باشند (۴۸). علاوه بر ایکسودس رسیوس که در کل اروپا ناقل آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم است (۴۶) انتقال آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم 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 آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم را در کنه‌های ایکسودس پرسولکاتوس و درماستور سیلوارم تشخیص دادند (۶). Kim و همکاران (۲۰۰۳) در کره و Kawahara و همکاران (۲۰۰۶) در ژاپن ژن ۱۶S rRNA آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم را در کنه همافیزالیس لانگی کورنپس تشخیص دادند (۱۸، ۲۱). Keysary و همکاران (۲۰۰۷) در اسرائیل ژن ۱۶SrRNA آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم را در کنه‌های هیالوما مارچیناتوم، ریپی سفالوس تورانیوس، بوئوفیلوس کلسی یافتند (۱۹). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پرندگان مهاجر نقش مهمی در پراکنش کنه‌های ناقل آلوده به آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم دارند (۴۳). با توجه به اینکه وجود آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم 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 آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم 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 بر توجه به مهاجرت پرندگان از روسیه به شمال ایران و دریاچه خزر احتمال انتقال و پراکنش کنه‌های ناقل آنپلاسما فاگوسیتوفیلوم 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 آنپلاسما 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 (۲۰٪) می‌باشد (جدول ۲). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p < 0.05$). در تحقیقات Splitter و همکاران (۱۹۵۶) نیز این تفاوت معنی‌دار نبوده است (۴۶). به غیر سنین زیر ۱ سال و بالای ۵ سال، که تعداد نمونه غیر قابل توجه می‌باشد، آلودگی در سنین ۱-۳ سال بیشتر از ۳-۵ سال بوده است. در حالی که 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

شناسایی کنه‌های گوسفندان آلوده به آناپلازما 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 آناپلازما اوویس در منطقه دور از انتظار نمی‌باشد.

با توجه به (جدول ۳)، درصد آلودگی آناپلازما 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 آناپلازما فاگوسیتوفیلوم در این 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 آناپلازما اوویس بحساب آوریم، لذا افزایش درصد آلودگی در فصل زمستان قابل پیش‌بینی است. البته انتظار می‌رود که در آینده، تحقیقات در راستای شناسایی آلودگی کنه‌ها ی سخت رایج در منطقه به باکتری آناپلازما متمرکز گردد.

همچنین درصد آلودگی آناپلازما اوویس در بین 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 (جدول ۳). 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 آناپلازما 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 آناپلازما اوویس در جنس نر و ماده به ترتیب (۲۳/۳٪) و (۶۳/۸٪) است. با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). (جدول ۳). احتمالاً 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 آناپلازما 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. اصولاً در ارتفاعات بالاتر فعالیت کنه‌ها بخصوص کنه‌های جنس ایکسودس زیادتر می‌باشد (۸). این امر خود می‌تواند دلیل بر افزایش درصد آلودگی دام‌ها به آناپلازما اوویس در این تحقیق باشد. البته این امر نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه دارد. در ارتباط با درصد آلودگی گوسفندان به آناپلازما اوویس در طول جغرافیائی ۵۳-۵۱ درجه (۶۳/۵٪) و ۵۳ درجه (۰٪)، است. با انجام

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

آنپلاسموزیس گاوی ایجاد شده بواسطه آناپلازما مارچیناله 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 آناپلازما اوویس در گوسفندان اهلی باعث عوارض و بیماری می‌شود و این عامل برای گاو بیماری‌زا نیست (۷).

تشخیص آناپلازما 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 آناپلازما 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).

آنپلازما اوویس و آنپلازما مارچیناله از نظر ریخت‌شناسی، بیولوژی، و انتقال از طریق کنه مشابه‌اند ولی در توانایی بیماری‌زایی در میزبان‌های اختصاصی متفاوت عمل می‌کنند. تلقیح آنپلازما اوویس به گوساله‌های طحال‌برداری شده باعث گسترش عفونت و نشانه‌های بالینی نمی‌شود درصورتی که تلقیح آنپلازما مارچیناله به گوسفندان طحال‌برداری شده باعث گسترش عفونت در گوسفند می‌شود، بنابراین آنپلازما مارچیناله توانایی آلوده کردن گوسفند و گاو را دارد ولی آنپلازما اوویس نمی‌تواند آلودگی پایدار در گاو ایجاد نماید (۳۳) بنابراین تفریق دو گونه آنپلازما اوویس و آنپلازما مارچیناله در گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. Lew و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، گنجیدگی‌های آنپلازما اوویس و آنپلازما مارچیناله در حاشیه گلبول‌های قرمز قرار می‌گیرند و علی‌رغم 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 ژن *msp4* آنپلازما 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 در آزمایش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آنپلازما اوویس تکثیر و باند ۸۶۶bp تشکیل دادند (جدول ۱). لذا میزان آلودگی گوسفندان منطقه به آنپلازما اوویس نسبتاً بالا است. در بررسی انجام شده توسط نعمان و همکاران (۲۰۱۰) در گوسفندان استان اصفهان بر اساس ژن *rRNA* ۱۶S مشخص شد که ۳۳٪ از نمونه‌ها در آزمایش 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

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: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International Journal of Systematic 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., Telmadarrayi, 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.

آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). (جدول ۳). اگرچه شرایط جغرافیایی در شیوه آلودگی به آناپلازما اوویس نقش مهمی دارد (۴۴)، اما شاید دلیل مهم این امر پوشش جنگلی نسبتاً زیاد مناطق غرب استان، نسبت به مناطق شرقی استان باشد که بدنبال آن سبب افزایش فعالیت کنه‌ها و حشرات حامل باکتری آناپلازما می‌گردند. تحقیقات انجام گرفته توسط واحدی و همکاران (۲۰۱۶) در ارتباط با فعالیت کنه‌های استان مازندران نیز این موضوع را تأیید می‌نماید (۵۱). در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گوسفندان مورد مطالعه به آناپلازما اوویس و نوع دامداری (سنتی- نیمه صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۶۰/۱٪) و نیمه صنعتی (۴۶/۲٪) بدست آمده است (جدول ۳). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p < 0.05$). با این حال درصد آلودگی در دامداری سنتی به مراتب بیشتر از دامداری نیمه صنعتی، می‌باشد. رعایت برخی مسائل بهداشتی نظیر تعویض سر سوزن‌های مصرفی، استفاده موقوع 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 آناپلازما در دام‌ها و همچنین امکان آلودگی انسان با گونه‌های شناسایی 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 *Anaplasma 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., Gu, X.M., Yang, H., Richardus, J. H., Habbema, J. DIK F (2006) Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents

- 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., & Esmailkhanian, 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

- 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 granulocytic 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., Amusatogui, 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 wide-spread 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.

