14(2) 1-8, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Identification of *Anaplasma* species and their prevalence in cattle and sheep in northeastern Iran by molecular methods

***Parastoo Poorghafoor Langroodi* [*1], *Vahid Noaman* [2]**

[1]*Department of Animal Bacterial Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran*
[2]*Department of Animal Parasitic Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran*

Key Words
Anaplasma species
Cattle
Sheep
Golestan
Molecular method

Abstract

Introduction: *Anaplasma* is an intracellular, gram-negative bacterium infecting different blood cells in animals and anaplasmosis is endemic worldwide in tropical and subtropical areas. This study aimed to determine the variety of *Anaplasma* species among cattle and sheep of the Golestan province, Iran.

Materials & Methods: A total of 400 blood samples were collected via the jugular vein from healthy cattle (200) and sheep (200), randomly. The extracted DNA from blood cells was amplified by Anaplasma-all primers, which amplify a fragment from the region of the 16S rRNA gene from various members of the genus *Anaplasma*.

Result: Sixteen out of 200 cattle blood samples and two out of 200 sheep blood samples were *Anaplasma* spp. positive by first PCR. *A. phagocytophilum* was identified by specific nested PCR in 1% of cattle blood samples, only. Fourteen out of 200 cattle blood samples (7%) and two out of 200 sheep blood samples (1%) were positive for *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis*, respectively. Chi-square (χ^2) tests were used to compare molecular prevalence values relative to farm Type, hygiene of the farm, tick infestation, use of acaricides by the farmer, distance from other farms, contact with wild animals, farm density, age, and sex. *Anaplasma* spp. prevalence in cattle was significantly related to tick infestation and age ($P<0.05$). *Anaplasma* spp. prevalence in sheep was significantly related to tick infestation and application of ectoparasiticides ($P<0.05$).

Conclusion: This analysis demonstrated that there are at least three different *Anaplasma* species widespread among ruminants in the Golestan province.

* Corresponding Author's email: poorghafoor@yahoo.com
Received: 29 April 2021; Reviewed: 5 June 2021; Revised: 9 August 2021; Accepted: 13 September 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.301970.2624

مقاله پژوهشی

تعیین گونه‌های آناپلاسما و میزان شیوع آن‌ها در گاوها و گوسفندان شمال‌شرق ایران به روش ملکولی

پرستو پورغفورلنگرودی[۱]، وحید نعمان[۲]*

[۱] بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۲] بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

کلمات کلیدی
گونه‌های آناپلاسما
گاو
گوسفند
گلستان
روش ملکولی

چکیده

مقدمه: آناپلاسما باکتری درون سلولی و گرم منفی است که سلول‌های خونی مختلف حیوانات را آلوده می‌کند. معمولاً شیوع آناپلاسموزیس در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان به‌صورت اندمیک دیده می‌شود. این مطالعه باهدف تعیین تنوع گونه‌های آناپلاسما در بین گاوها و گوسفندان استان گلستان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ٤۰۰ نمونه خون از طریق رگ گردن گاوها (۲۰۰ رأس) و گوسفندان (۲۰۰ رأس) به‌ظاهر سالم به‌طور تصادفی از منطقه موردنظر جمع‌آوری شد. در ابتدا DNA استخراجی از نمونه‌های خونی با جفت آغازگری از ژن 16SrRNA که جنس آناپلاسما را تکثیر می‌کردند، تکثیر شد.

نتایج: در اولین PCR تعداد ۱٦ نمونه از ۲۰۰ نمونه گاوی و ۲ نمونه از ۲۰۰ نمونه گوسفندی از نظر جنس آناپلاسما مثبت شدند. تنها یک در صد از نمونه‌های گاوی از نظر آناپلاسما فاگوسیتوفیلم مثبت تشخیص داده شد. تعداد ۱٤ نمونه از ۲۰۰ نمونه گاوی (۷٪) و ۲ نمونه از ۲۰۰ نمونه گوسفندی(۱٪) به‌ترتیب از نظر آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما اوویس مثبت‌بودند.آزمون کای-مربع جهت مقایسه میزان شیوع نسبت به نوع، سطح بهداشت دامداری، حضور کنه روی دام، سم‌پاشی در فصول تکثیر کنه، فاصله بین دامداری‌ها، تماس با نشخوارکنندگان وحشی، تراکم، سن و جنس انجام شد. نتایج نشان دادکه در گاوها شیوع آناپلاسما با آلودگی با کنه و سن ارتباط معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین در گوسفندان شیوع آناپلاسما با آلودگی با کنه و استفاده از کنه‌کش در دامداری ارتباط معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که در نشخوارکنندگان استان گلستان حداقل سه گونه مختلف آناپلاسما وجود دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: poorghafoor@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۵ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۸ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۲ شهریور ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.301970.2624

مقدمه

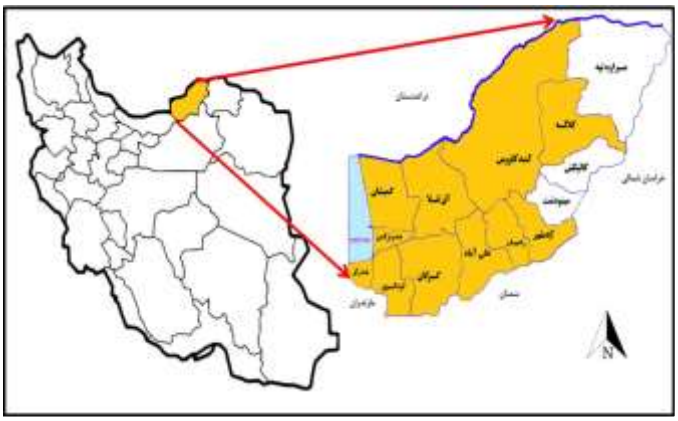
آناپلاسموزیس بیماری است که از طریق کنه منتقل شده و توسط عوامل بیماری‌زای داخل سلولی از جنس آناپلاسما که متعلق به خانواده آناپلاسماتاسه آ، راسته ریکتزیاله و دسته آلفا پروتئوباکتریا می‌باشند ایجاد می‌شود. این بیماری به‌طور گسترده در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری گسترش دارد و نشخوارکنندگان اهلی و وحشی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). عوارضی از قبیل تب، کم‌خونی پیش‌رونده، زردی، کاهش تولید شیر و گوشت از علائم آناپلاسموزیس می‌باشد (۲). شش گونه آناپلاسما در نشخوارکنندگان بیماری ایجاد می‌کنند. آناپلاسما مارجیناله بیماری‌زاترین گونه و آناپلاسما سنتراله بیماری‌زایی کمی در گاو دارد. در نشخوارکنندگان کوچک، آناپلاسما اوویس شدت بیماری‌زایی متوسط دارد اما تحت استرس می‌تواند باعث بیماری شدید در گوسفندان شود. آناپلاسما فاگوسیتوفیلم عامل ایجاد تب کنه‌ای در نشخوارکنندگان است و می‌تواند علائم تحت بالینی تا شدید در حیوان ایجاد کند و باعث سقط و اختلالات تولیدمثلی در نشخوارکنندگان گردد. گونه‌های آناپلاسما بوویس و آناپلاسما پلاتیس اگرچه در نشخوارکنندگان گزارش‌شده‌اند ولی علائم بالینی مشخصی برای این دو گونه توصیف نشده است (۳). به‌دلیل مشترک بودن دو گونه آناپلاسما فاگوسیتوفیلم و آناپلاسما اوویس بین انسان و حیوانات، در مطالعه اخیر این دو گونه مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (۴). آناپلاسموزیس به‌طور گسترده در سراسر جهان از جمله مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا، آمریکای جنوبی، آمریکای مرکزی و شمالی، اروپا، آفریقا و استرالیا با شیوع ۱ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۵). در ایران شیوع کلی آلودگی در نشخوارکنندگان ۳۴٪ گزارش‌شده است (۶). در کشورهای همسایه، ازجمله روسیه، پاکستان، ترکیه و عراق نیز آلودگی با گونه‌های آناپلاسما گزارش شده است (۷، ۸، ۹، ۱۰). اگرچه در بیش‌تر تحقیقاتی که در مناطق مختلف ایران انجام شده‌است، تشخیص گونه‌های آناپلاسما براساس مشاهده میکروسکوپی گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده بوده است، ولی این روش برای تمایز گونه‌های آناپلاسما و تفریق آن‌ها از دیگر انگل‌های خونی قابل اعتماد نیست (۱۱). در حال حاضر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) که دارای حساسیت و ویژگی بالایی است به‌طور گسترده‌ای در تشخیص قطعی گونه‌های آناپلاسما مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش هم‌چنین در شناسایی مرحله حاد عفونت اولیه و دام‌های حامل قابل استفاده می‌باشد (۱۲). با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از آناپلاسموزیس در نشخوارکنندگان اهلی دنیا، شناسایی گونه‌های آناپلاسما در دام‌های مناطق مختلف ضروری است. از آن‌جایی‌که درخصوص گونه‌های آناپلاسما در جمعیت گاو و گوسفند استان گلستان اطلاعاتی موجود نبود، لذا این تحقیق با هدف شناسایی ملکولی گونه‌های آناپلاسما در گاو و گوسفند این استان انجام شد.

مواد و روش‌ها

محل مورد مطالعه: استان گلستان در محدوده بین ۵۳ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۵۶ درجه و ۲۲ دقیقه طول شرقی و ۳۶ درجه و ۳۰ دقیقه تا ۳۸ درجه و ۸ دقیقه عرض شمالی در شمال کشور واقع گردیده است. این استان از شمال به کشور ترکمنستان، از جنوب به استان سمنان، از شرق به استان خراسان شمالی و از غرب به دریای خزر و استان مازندران محدود می‌شود. مساحت استان گلستان بالغ بر ۲۰۴۳۸ کیلومترمربع (۱/۳ درصد از کل مساحت کشور و رتبه ۲۱ در بین استان‌ها) است. با توجه به نحوه قرار گرفتن رشته‌کوه‌های البرز و جلگه‌های سواحل جنوبی و شرقی دریای خزر و نیز با توجه به تأثیر عرض و ارتفاع جغرافیایی، دوری و نزدیکی به دریا، وجود بیابان‌های جنوبی ترکمنستان، وزش بادهای محلی و پوشش متراکم جنگلی، استان گلستان از نظر اقلیمی به سه بخش آب و هوای معتدل گرم و بارانی بازمستانی ملایم در حدّفاصل بین قره‌سو و کوهستان، آب و هوای صحرایی گرم در ناحیه اترک و گرگان رود و آب و هوای بیابانی گرم و خشک با بارندگی کم در ناحیه کوچکی از شمال منطقه گرگان تقسیم می‌شود (۱۳). به‌طورکلی استان گلستان در بیش‌تر قسمت‌ها دارای آب و هوای معتدل مدیترانه‌ای است ولی قسمت‌های جلگه‌ای و اراضی پست گرگان به‌لحاظ مجاورت با صحرای ترکمنستان، دوری از دریا و کاهش ارتفاعات، آب‌وهوای نیمه بیابانی و گرم دارد. تعداد گاو و گوساله استان ۳۳۶۰۰۰ رأس و گوسفند و بز ۱۵۹۴۰۰۰ رأس با تولیدسالیانه ۳۵۱۸۰۰ تن شیر و ۲۷۶۰۰ تن گوشت قرمز بوده که از این تعداد ۲۷۰۰۰ رأس آن گاو هلشتاین، تعداد ۲۸۰۰۰۰ رأس گاو دو رگ، تعداد ۲۹۰۰۰ رأس گاو بومی، تعداد ۱۴۰۶۰۰۰رأس گوسفند و تعداد ۱۸۸۰۰۰ رأس بز می‌باشند.

جامعه آماری و روش نمونه‌گیری: مطالعه به‌صورت توصیفی مقطعی بر روی ۲۰۰ رأس گاو و ۲۰۰ رأس گوسفند در گاوداری‌ها و گوسفندداری‌های نیمه‌صنعتی و سنتی استان گلستان در شهرستان‌های کلاله، گنبدکاووس، آق‌قلا، گمیشان، بندر ترکمن، بندرگز، کردکوی، گرگان، علی‌آباد، رامیان و آزادشهر با همکاری کارکنان محترم بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی استان گلستان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت (شکل ۱). نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی از ۴۰ گاوداری و ۴۰ گوسفندداری انجام و از هر دامداری حداقل از ۵ دام نمونه‌برداری انجام شد. از هر دام ۲ میلی‌لیتر خون از ورید وداج گرفته و به لوله حاوی ماده ضدانعقاد منتقل گردید.

هم‌چنین برای هر نمونه پرسشنامه‌ای تهیه شد و نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی و بیولوژی ملکولی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تحویل شدند.



شکل ۱: موقعیت استان گلستان در نقشه ایران و شهرستان‌های نمونه‌گیری شده که به‌صورت رنگی نمایش داده شده‌اند.

در هر مراجعه به دامداری‌های از پیش تعیین شده، دام‌ها به‌طور تصادفی انتخاب و در هر مورد بازدید و نمونه‌گیری اطلاعاتی شامل نام دامدار، روستا/ منطقه، تعداد دام، کد دام، سابقه بیماری در گله، نوع دامداری از نظر مدیریت (به دامداری‌هایی که اصول علمی به‌طور نسبی در ساخت و ساز ساختمان‌ها و تأسیسات آن‌ها اعمال‌شده و دارای ماشین‌آلات و تجهیزات در حد رفع نیازهای اساسی خود می‌باشند دامداری نیمه‌صنعتی و به دامداری‌هایی که بدون اصول علم دامپروری در داخل و حاشیه روستا احداث گردیده‌اند دامداری سنتی گویند) براساس مستندات مدیریت امور دام استان گلستان (نیمه‌صنعتی، سنتی)، سطح بهداشتی دامداری (شامل بهداشت جایگاه، بهداشت شیردوشی و پستان، بهداشت زایشگاه و زایمان، بهداشت گوساله‌دانی، بهداشت انبار علوفه، بهداشت آب، انجام برنامه‌های کنترل و پیشگیری از بیماری‌های عفونی و انگلی) براساس مستندات و ضوابط شبکه دامپزشکی استان گلستان (خوب، پایین)، حضور کنه روی بدن دام (خیر، بله) براساس مشاهده و گفته دامدار، سم‌پاشی در فصول تکثیر کنه (خیر، بله) براساس گفته دامدار، فاصله با دامداری‌های دیگر (۱ کیلومتر≤، ۱ کیلومتر>)، تماس با نشخوارکنندگان وحشی (خیر، بله)، تراکم در دامداری براساس اصول ساخت جایگاه دامداری (بالا، معمولی)، سن دام (۱ تا ۳ سال، بیش از ۳ سال) براساس گفته دامدار، جنس دام (نر، ماده) براساس مشاهده در فرم مربوطه ثبت و شماره فرم بر روی کلیه لوله‌ها و گسترش‌ها درج می‌شد. نژاد گاوهای نمونه‌گیری شده دو رگ و نژاد گوسفندان نمونه‌گیری شده همگی بومی بود. نحوه تغذیه گاوها در داخل دامداری و گوسفندان به شکل چرای آزاد انجام می‌شد. کلیه نمونه‌ها در فصل تابستان، ارتفاع ۵۰۰-۰ متر بالای سطح دریا، طول جغرافیایی بیش از ۵۴ درجه شرقی و عرض جغرافیایی بیش از ۳۶ درجه شمالی اخذ شد.

استخراج DNA از خون: به‌منظور به‌دست آوردن ماده ژنتیکی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، استخراج DNA انجام شد. در این تحقیق از کیت استخراج DNA سلول‌های خون و بافت ساخته شده توسط شرکت MBST(ایران) استفاده گردید و طبق دستورالعمل سازنده استخراج DNA صورت پذیرفت. جهت تعیین میزان و خلوص DNA استخراجی، چگالی نوری محصول مورد نظر با استفاده از اسپکتروفتومتر و با طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. علاوه بر این، DNA استخراجی بر روی ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۲).

واکنش زنجیره پلیمراز و واکنش زنجیره پلیمراز- آشیانه‌ای: در این تحقیق برای شناسایی جنس آناپلاسما از دو آغازگر رو به جلو fD1 و معکوس Rp2 از ژن 16S rRNA که قطعه‌ای در حدود ۱۴۶۸ جفت باز را تکثیر می‌کردند استفاده شد. در واکنش‌های زنجیره پلیمراز- آشیانه‌ای از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید. در این واکنش‌ها برای تکثیر اختصاصی آناپلاسما فاگوسیتو فیلم، آناپلاسما بوویس و آناپلاسما سنتراله از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد محصول مورد انتظار به‌ترتیب حاوی ۹۲۶، ۵۵۱ و ۴۰۳ جفت باز بود. در واکنش زنجیره پلیمراز برای شناسایی آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسما اوویس از دو آغازگر رو به جلو MSP45 و معکوس MSP43 از ژن msp4 که قطعه‌ای در حدود ۸۶۶ جفت بازی را تکثیر می‌کردند استفاده شد (جدول ۱). کلیه واکنش‌ها در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرو لیتری و در حجم ۲۵ میکرولیتر به‌شرح زیر انجام شد: ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر روبه‌جلو (۲۰ میکرومولار) با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس (۲۰ میکرومولار) با غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (5U/µL) با غلظت نهایی ۰/۶۲۵ واحد در ۲۵ میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (X10)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر DNA الگو مخصوص هر نمونه و ۱۹/۱۲۵ میکرولیتر آب مقطر (دو بار تقطیر استریل). پس از ترکیب مواد موردنیاز میکروتیوب‌ها به ترموسایکلر (بیو راد تی-۱۰۰، ساخت آمریکا) در ۳۵ چرخه با برنامه دمایی زیر منتقل گردید: انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوره شدن دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال DNA در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه. پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر محصولات PCR روی ژل آگارز یک ونیم درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. در مرحله آخر برای مشاهده باندها در سطح ژل، به‌مدت ۲۰ دقیقه ژل مورد نظر با رعایت تمام پروتوکل‌های ایمنی در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده شد و پس از شست و شوی با آب مقطر برای نمایان شدن باندها در دستگاه تابنده اشعه فرابنفش (ژل داکیومنتیشن) قرار گرفت.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای واکنش زنجیره پلیمراز و پلیمراز- آشیانه‌ای جهت تشخیص جنس و گونه‌های آناپلاسما

نام آغازگر	روش	ژن هدف	توالی آغازگر(′3-′5)	گونه آناپلاسما	منبع	اندازه
Anaplasma all (fD1)	PCR	16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	*Anaplasma* spp.	۱۴	1468 bp
Anaplasma all (Rp2)			ACGGCTACCTTGTTACGACTT			
Aphago (F)	Nested-PCR	16S rRNA	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC	*A. phagocytophilum*	۱۵	926 bp
Aphago (R)			CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC			
Abovis (F)	Nested-PCR	16S rRNA	CTCGTAGCTTGCTATGAGAAC	*A. bovis*	۱۶	551 bp
Abovis (R)			TCTCCCGGACTCCAGTCTG			
Acentrale (F)	Nested-PCR	16S rRNA	CAAATCTGTAGCTTGCTACGGA	*A. centrale (Amori)*	۱۷	403 bp
Acentrale (R)			GAGTTTGCCGGGACTTCTTCT			
MSP45(F)	PCR	*msp4*	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC	*A. marginale/A.ovis*	۱۸	867 bp
MSP43(R)			CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC			

محاسبات آماری: نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش بیستم مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای محاسبه فراوانی داده‌ها و برای پی بردن به این‌که کدام‌یک از فراوانی‌ها با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری دارند، از آزمون مربع کای (χ^2) استفاده شد. α= ۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری درنظر گرفته شد.

نتایج

در مجموع از ۲۰۰ نمونه خون گاو بررسی شده در واکنش زنجیره پلیمراز ۱۶ (۸٪) نمونه از نظر جنس آناپلاسما مثبت تشخیص داده شدند و از مجموع ۲۰۰ نمونه خون گوسفند بررسی شده در واکنش زنجیره پلیمراز ۲ (۱٪) نمونه از نظر جنس آناپلاسما مثبت تشخیص داده شدند (جدول۲). در واکنش زنجیره پلیمراز آشیانه‌ای اختصاصی آناپلاسما فاگوسیتوفیلم ۲ نمونه (۱٪)، در واکنش زنجیره پلیمراز- آشیانه‌ای اختصاصی آناپلاسما بوویس و آناپلاسما سنتراله در هیچ‌یک از نمونه‌ها تکثیری انجام نشد و کلیه نمونه‌ها از نظراین دو گونه منفی تلقی گردیدند. در واکنش زنجیره پلیمراز مخصوص آناپلاسما مارجیناله در مجموع از ۲۰۰ نمونه خون گاو بررسی شده ۱۴ نمونه (۷٪) از ۲۰۰ نمونه مورد آزمایش باند مورد نظر را تشکیل دادند. در واکنش زنجیره پلیمراز مخصوص آناپلاسما اوویس در مجموع از ۲۰۰ نمونه خون گوسفند بررسی شده ۲ نمونه (۱٪) از ۲۰۰ نمونه مورد آزمایش باند مورد نظر را تشکیل دادند. فراوانی جنس آناپلاسما در گاوهایی که کنه روی بدن آن‌ها مشاهده شد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گاوهای عاری از کنه بود (P=۰/۰۱۱، χ^2 =۶/۴۴). هم‌چنین فراوانی جنس آناپلاسما در گوسفندانی که کنه روی بدن آن‌ها مشاهده شد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گوسفندان عاری از کنه بود (P=۰/۰۱۴، χ^2 =۶/۰۶). در گوسفندهایی که سم‌پاشی در فصول شیوع کنه انجام نمی‌شد فراوانی جنس آناپلاسما به‌طور معنی‌داری بیش از گوسفندانی بود که سم‌پاشی ضد کنه انجام می‌گرفت (P=۰/۰۴۸، χ^2 =۳/۹۲). هم‌چنین در مقایسه فراوانی جنس آناپلاسما در گاو بین سنین مختلف (بیش از ۳ سال، کم‌تر از ۳ سال) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و بیش‌ترین فراوانی مربوط به سن بیش از ۳ سال بود (P=۰/۰۰۵، χ^2 =۷/۹۴). در مقایسه فراوانی آناپلاسما از نظر نوع دامداری، مدیریت، سطح بهداشت دامداری، فاصله با دامداری‌های دیگر، تماس با نشخوارکنندگان وحشی، تراکم در دامداری و جنس اختلاف معنی‌داری در گاوها و گوسفندان مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲:میزان شیوع ملکولی گونه‌های *آناپلاسما* در گاو و گوسفند بر حسب برخی عوامل خطر در استان گلستان *(P<۰/۰۵)

متغیر	گروه	گاو				گوسفند			
		آزمایش شده	تعداد مثبت	درصد	χ^2 درجه آزادی *P*-value	آزمایش شده	تعداد مثبت	درصد	χ^2 درجه آزادی *P*-value
کل	حیوان	۲۰۰	۱۶	۸	-	۲۰۰	۲	۱	-
	نیمه‌صنعتی	۱۶۲	۱۲	۷/۴	۰/۴۰۷	۴۶	۰	۰	۰/۶۰۳
نوع دامداری از نظر مدیریت	سنتی	۳۸	۴	۱۰/۵	۱ ۰/۵۲۴	۱۵۴	۲	۱/۳	۱ ۰/۴۳۷
سطح بهداشت دامداری	خوب	۱۰	۰	۰	۰/۹۱۵	۱۸	۰	۴/۱۳	۰/۲۰۰
	پایین	۱۹۰	۱۶	۸/۴	۱ ۰/۳۳۹	۱۸۲	۲	۱/۱	۱ ۰/۶۵۵
حضور کنه روی بدن دام	خیر	۱۵۲	۸	۵/۳	۶/۴۴۵	۱۵۰	۰	۰	۶/۰۶۱
	بله	۴۸	۸	۱۶/۷	۱ ۰/۰۱۱*	۵۰	۲	۴	۱ ۰/۰۱۴*
سم پاشی در فصول تکثیر کنه	خیر	۶۲	۴	۶/۵	۰/۲۹۳	۶۸	۲	۲/۹	۳/۹۲۲
	بله	۱۳۸	۱۲	۸/۷	۱ ۰/۵۸۸	۱۳۲	۰	۰	۱ ۰/۰۴۸*
فاصله با دامداری‌های دیگر	۱ کیلومتر≤	۱۶۸	۱۶	۹/۵	۳/۳۱۳	۱۰۴	۲	۱/۹	۱/۸۶۵
	۱ کیلومتر<	۳۲	۰	۰	۱ ۰/۰۶۹	۹۶	۰	۰	۱ ۰/۱۷۲
تماس با نشخوارکنندگان وحشی	خیر	۱۸۶	۱۶	۸/۶	۱/۳۰۹	۱۸۸	۲	۱/۱	۰/۱۲۹
	بله	۱۴	۰	۰	۱ ۰/۲۵۳	۱۲	۰	۰	۱ ۰/۱۳۹
تراکم در دامداری	بالا	۱۱۰	۸	۷/۳	۰/۱۷۶	۱۰۴	۰	۰	۲/۱۸۹
	معمولی	۹۰	۸	۸/۹	۱ ۰/۶۷۵	۹۶	۲	۲/۱	۱ ۰/۱۳۹
سن	۳-۱ سال	۴۴	۸	۱۸/۲	۷/۹۴۶	۱۵۶	۲	۱/۳	۰/۵۷۰
	۳< سال	۱۵۶	۸	۵/۱	۱ ۰/۰۰۵*	۴۴	۰	۰	۱ ۰/۴۵۰
جنس	ماده	۲۰۰	۱۶	۸	.	۱۶۲	۲	۱/۲	۰/۴۷۴
	نر	-	-	-	. .	۳۸	۰	۰	۱ ۰/۴۹۱

بحث

آناپلاسموزیس ناشی از گونه‌های مختلف جنس *آناپلاسما* در مناطق مختلف شش‌قاره جهان گزارش شده است. اگرچه آناپلاسموزیس در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بیش‌تر اتفاق می‌افتد ولی یکی از مشکلات پرورش‌دهندگان نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک در کل دنیا به‌شمار می‌رود و از نظر اقتصادی ضررهای زیادی را به صنعت دامپروری کشورهای جهان وارد می‌سازد (۵). آناپلاسموزیس نسبت به بسیاری از بیماری‌های قابل انتقال به‌وسیله بندپایان انتشار بیش‌تری دارد که این انتشار وسیع به‌علت تعدد ناقلین، افزایش فرصت انتقال مکانیکی عامل بیماری از دام‌های مبتلا به عفونت پایدار و بدون علائم بالینی به دام‌های سالم، افزایش نقل و انتقال دام و روند گرم شدن کره زمین و تأثیر در انتقال ناقلین کنه‌ای می‌باشد (۱۹). اگرچه انتقال گونه‌های آناپلاسما می‌تواند به‌صورت مکانیکی انجام شود ولی انتقال بیولوژیک گونه‌های *آناپلاسما* توسط کنه انجام می‌شود (۲۰) و تقریباً ۲۰ گونه کنه در کل جهان به‌عنوان ناقل درنظر گرفته شده‌اند (۳).

در استان گلستان جنس آناپلاسما از هفت گونه *هیالوما* و دو گونه *ریپی سفالوس* جمع‌آوری شده از نشخوارکنندگان اهلی گزارش شده است (۲۱). اخیراً گونه‌های *آناپلاسما مارجیناله*، *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما اوویس* با آزمون‌های ملکولی اختصاصی در شترهای استان گلستان شناسایی شده‌اند (۲۲، ۲۳). در بررسی حاضر *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در یک درصد گاوهای مورد نمونه‌گیری شناسایی و در هیچ‌یک از گوسفندان مورد نمونه‌گیری این عامل مشاهده نشد، درحالی‌که در بررسی مشابه انجام شده در استان گیلان *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در ۳۳ درصد از گاوها و ۵درصد از گوسفندان مورد مطالعه شناسایی شد و فصل نمونه‌گیری به‌عنوان فاکتور خطر ابتلا به این‌گونه اعلام شد (۲۴). در بررسی دیگری که در شهر تالش در استان گیلان انجام گرفت نیز *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در ۲۴/۶ درصد از گاوها شناسایی شد (۲۵). در استان مازندران نیز در بررسی‌های انجام گرفته *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در ۲۰ درصد از گاوها(۲۶)و ۲۳/۲ درصد از گوسفندان مورد مطالعه مشاهده شد (۲۷). مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات انجام گرفته در استان‌های شمالی ایران نشان می‌دهد که الگوی آلودگی نشخوارکنندگان اهلی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در استان گلستان با دیگر استان‌های شمالی متفاوت است. در مطالعه جامع انجام شده در ایران شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاو ۱۵/۵ درصد برآورد شده‌است (۲۸). میزان شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاوهای کشورهای همسایه ایران از جمله عراق ترکیه و پاکستان به‌ترتیب ۴۰، ۳۰/۸ و ۲/۶۶ گزارش شده است (۲۹، ۳۰، ۳۱). تجزیه و تحلیل عوامل خطر در ایران نشان می‌دهد که آب و هوا، ارتفاع، طول جغرافیایی، عرض جغرافیایی، فصل، روش تغذیه و بهداشت دامداری در شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* تعیین‌کننده می‌باشند(۲۸). لذا اختلاف شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در مناطق مختلف به عوامل ذکر شده وابسته می‌باشند. در بررسی حاضر *آناپلاسما مارجیناله* در ۷ درصد گاوهای مورد نمونه‌گیری شناسایی شد که با میزان شیوع ۴/۸ درصدی *آناپلاسما مارجیناله* در گاوهای استان مازندران هم‌خوانی دارد (۲۶). ولی نتایج بررسی که در شهر تالش در استان گیلان انجام گرفت، میزان شیوع *آناپلاسما مارجیناله* را ۳۵/۳ درصد اعلام کرد (۲۵) که کم‌تر از مطالعه حاضر است. در دیگر تحقیقات انجام شده در ایران با استفاده از روش‌های ملکولی شیوع *آناپلاسما مارجیناله* در گاوهای استان‌های آذربایجان غربی ۰٪، در اصفهان ۳۸/۷٪ و در خوزستان ۴۴٪ تعیین شده است (۳۲، ۳۳، ۳۴). بدین ترتیب، شیوع *آناپلاسما مارجیناله* در استان گلستان نسبت به شیوع آن در استان‌های مرکزی و جنوب‌غربی ایران بسیار کم‌تر است. در کشورهای آسیایی نیز میزان شیوع *آناپلاسما مارجیناله* با روش‌های ملکولی برابر ۱۵/۱۷٪ در پاکستان، ۲۰٪ در عراق، ۳۱٪ در ترکیه، ۶۷/۳٪ در فیلیپین و ۷۲/۶٪ در مالزی گزارش شده است (۳۵، ۳۶، ۲۹، ۳۷، ۳۸). علاوه بر تفاوت‌های اکولوژیکی و ناقلین در مناطق مختلف که در میزان شیوع *آناپلاسما مارجیناله* مؤثر می‌باشند، انتخاب آغازگر از ژن‌های مناسب، روش جمع‌آوری نمونه، روش ذخیره خون و روش استخراج DNA از دلایل تفاوت نتایج در آزمون‌های ملکولی می‌باشند (۳۶). میزان شیوع *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان مورد مطالعه ۱ درصد به‌دست آمد. مطالعات پیشین آلودگی ۵ تا ۸۷ درصدی گوسفندان را در مناطق مختلف ایران نشان می‌دهد (۳۹، ۳۳، ۴۰، ۴۱، ۲۷). در دو مطالعه انجام شده در پاکستان شیوع *آناپلاسما اوویس* در گوسفندان ۲۱ و ۳۲ درصد گزارش شده است (۴۲، ۴۳). با این‌حال، در همسایگان غربی، شیوع *آناپلاسما اوویس* بدون علامت در گوسفندان ۶۰ و ۶۷/۶ درصد در ترکیه و ۶۶/۷ درصد در عراق گزارش به ثبت رسیده است (۴۴، ۴۵، ۴۶). این شیوع نسبتاً زیاد *آناپلاسما اوویس* در غرب آسیا باید به‌عنوان یک محدودیت مهم در پرورش گوسفند مورد توجه قرار گیرد و نیاز به بررسی‌های همه‌گیرشناسی و اقدامات کنترلی مناسب دارد. در بررسی‌های انجام شده در ایران آلودگی به *آناپلاسماااوویس*، بین فصول مختلف، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایی و جنس اختلاف داشت (۲۷). در این مطالعه فراوانی جنس *آناپلاسما* در گاوها و گوسفندانی که کنه روی بدن آن‌ها مشاهده شد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. تحقیقات در برزیل نیز نشان داد که حضور کنه بر روی دام در فراوانی آلودگی دام‌ها به آناپلاسما تأثیر دارد (۴۷). در این تحقیق در گوسفندهایی که سم‌پاشی در فصول شیوع کنه انجام نمی‌شد فراوانی جنس *آناپلاسما* به‌طور معنی‌داری بیش از گوسفندانی بود که سم‌پاشی ضدکنه انجام می‌گرفت. تحقیقات در پاکستان و برزیل نیز نشان دادند که دفعات کم سم‌پاشی در شیوع بالای آناپلاسما نقش دارد (۴۸، ۴۹). در این مطالعه بیش‌ترین فراوانی جنس *آناپلاسما* در سنین بیش از ۳ سال مشاهده شد. تحقیقات در هند نیز نشان داد سن بالای یک‌سال از عوامل خطر بالای آناپلاسموزیس می‌باشد (۵۰). نتیجه کلی این تحقیق نشان می‌دهد که عفونت *آناپلاسمایی* در گاوها و گوسفندان شمال شرق ایران (استان گلستان) اندمیک نیست. در این تحقیق تظاهرات بالینی ناشی از گونه‌های *آناپلاسما* در نشخوارکنندگان استان گلستان دیده‌نشد و میزان شیوع *آناپلاسما* نسبت به یافته‌های دیگر استان‌ها و برخی از کشورهای اطراف ایران کم‌تر است. هم‌چنین، مشاهده شد که حضور کنه بر روی دام، سم‌پاشی در فصل شیوع کنه و سن بالای ۳ سال به‌عنوان عوامل خطر ابتلای نشخوارکنندگان به *آناپلاسما* به‌شمار می‌آیند که در این مورد برای کاهش شیوع عفونت لازم است اقدامات بهداشتی و کنترلی مورد توجه بیش‌تری قرار گیرند. بیماری‌های قابل انتقال از کنه ازجمله آناپلاسموزیس جمعیت دامی کشور را مورد

تهدید قرار داده است ولی در ایران اطلاعات ناچیزی در خصوص همه‌گیرشناسی بیماری در دسترس است. افزایش آگاهی در دامداران سنتی (در مورد نحوه مبارزه با کنه، بیماری‌های منتقله از طریق کنه و چرخه زندگی کنه‌ها) از طریق کلاس‌های آموزشی-ترویجی یک روش مؤثر و ساده برای کنترل عوامل منتقله از کنه در کوتاه مدت می‌باشد. اطلاعات حاصل از این مطالعه می‌تواند در سیاست‌های سازمان دامپزشکی در جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های قابل انتقال از کنه در نشخوارکنندگان استان گلستان مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از کلیه عزیزانی که در نمونه‌گیری و عملیات آزمایشگاهی یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع: بدین‌وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی: هزینه‌های انجام این پژوهش از طرف موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در قالب زیر پروژه تحقیقاتی ۹۰۰۱۶-۱۸-۳۸-۰/۶ تامین گردیده است و عملیات آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه بیولوژی ملکولی دامپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انجام شده است.

منابع

1. **Berger, S., 2018.** Anaplasmosis: Global Status. in Berger, S., (ed.), Infectious Diseases of the World, Gideon Informatics, Incorporated, Los Angeles, California, USA. 40-43.
2. **Dantas-Torres, F. and Otranto, D., 2017.** Anaplasmosis. in CB Marcondes (ed.), Arthropod Borne Diseases, Springer, Cham, Switzerland. 215-222.
3. **Noaman, V., 2017.** A review of anaplasmosis and the prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Iran and the world. Veterinary Researches & Biological Products. 30(3): 2-15. (In Persian)
4. **Jiang, M., Yan, L., Shichen, X .,Shengzhong, X., Zhang, Y., Yan, Y., Yuanzhi, W. and Sheng, J., 2020.** *Anaplasma ovis* and *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Sheep and Wild Rodents from Northern Xinjiang, Northwest China. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 26(2): 295-298.
5. **Aubry, P. and Geale, D.W., 2011**. A review of bovine anaplasmosis. Transboundary and emerging diseases. 58(1): 1-30.
6. **Soosaraei, M., Haghi, M.M., Etemadifar, F., Fakhar, M., Teshnizi, S.H., Asfaram, S. and Esboei, B.R., 2020.** Status of *Anaplasma* spp. infection in domestic ruminants from Iran: A systematic review with meta-analysis. Parasite Epidemiology and Control. e00173.
7. **Aktas, M., Altay, K. and Dumanli, N., 2011.** Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. Ticks and tick-borne diseases. 2(1): 62-65.
8. **Ameen, K., Abdullah, B. and Abdul-Razaq, R., 2012.** Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. 26(3): 109-114.
9. **Atif, F., Khan, M., Iqbal, H. and Roheen, T., 2012.** Prevalence of tick-borne diseases in Punjab (Pakistan) and hematological profile of *Anaplasma marginale* infection in indigenous and crossbredcattle. Pakistan Journal of Science. 64(1).
10. **Rar, V.A., Livanova, N.N., Panov, V.V., Doroschenko, E.K., Pukhovskaya, N.M., Vysochina, N.P. and Ivanov, L.I., 2010.** Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia. Ticks and tick-borne diseases. 1(1): 57-65.
11. **Noaman, V. and Shayan, P., 2010.** Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. Iranian Journal of Microbiology. 2: 1-2.
12. **Noaman, V., 2013.** Discrimination between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* by PCR-RFLP. World Applied Science Journal. 21(2): 190-195.
13. **Yazarlo, M., Kami, H.Gh. and Bagherian Yazdi, A.A., 2020.** Habitat diversity and seasonal variations on the frequency of Caspian pond turtle, (*Mauremys caspica*) and determination of sex indexes grouping of specimens in Golestan province. Journal of Animal Environment. 12(1): 113-118. (In Persian)
14. **Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173(2): 697-703.
15. **Barlough, J.E., Madigan, J.E., DeRock, E. and Bigornia, L., 1996.** Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks *(Ixodes pacificus*). Veterinary Parasitology. 63(3-4): 319-329.
16. **Kawahara, M., Rikihisa, Y., Lin, Q., Isogai, E., Tahara, K., Itagaki, A., Hiramitsu, Y. and Tajima, T., 2006.** Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer andticks on two major islands in Japan. Applied and Environmental Microbiology. 72(2): 1102-1109.
17. **Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D. and Brouqui, P., 2001**.Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other *ehrlichiae*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 8(2): 241-244.
18. **de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Naranjo, V., de Mera, I.G.F., Mangold, A.J., Keating, K.A. and Kocan, K.M., 2007.** Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma ovis* strains. Veterinary Mcrobiology. Vol. 119, No. 2-4, pp: 375-81.
19. **Noaman, V., Allameh, S.K. and Nabavi, R., 2017.** Anaplasmosis in Ruminants of Iran: An Overview. Advanced Techniques in Clinical Microbiology. 1(2): 1-3.
20. **Akbari, M., Shayestehfar, A., Khodaei Motlagh, M., Talebi, M. and Pesarakloo, A., 2017.** Study of species diversity of animal ticks in Mashhad Mighan - Arak. Journal of Animal Environment. 9(3): 363-370. (In Persian)
21. **Jafar-Bekloo, A., Bakhshi, H., Soufizadeh, A., Sedaghat, M.M., Jafar-Bekloo, R., Ramzgouyan, M.R., Chegeni, A.H., Faghihi, F. and Telmadarraiy, Z., 2017.** Ticks circulate *Anaplasma, Ehrlichia, Babesia* and *Theileria* parasites in North of Iran. Veterinary parasitology. 248: 21-24.
22. **Poorghafoor langroodi, p., 2020.** Molecular and microscopy detection of *Anaplasma* species in camel of

marginale infection of cattle in Peninsular Malaysia. Parasitology international. 67(6): 659-665.

39. **Yousefi, A., Rahbari, S., Shayan, P., Sadeghi-dehkordi, Z. and Bahonar, A., 2017.** Molecular detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* in sheep and goat in west highland pasture of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 7(5): 455-459.

40. **Jalali, S., Khaki, Z., Kazemi, B ,.Bandehpour, M., Rahbari, S., Razi Jalali, M. and Yasini, S., 2013.** Molecular detection and identification of *Anaplasma* species in sheep from Ahvaz, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research. 14(1): 50-56.

41. **Noaman, V., Shayan, P. and Shahmoradi, A., 2009.** Detection of *Anaplasma ovis* based on 16S rRNA gene by PCR-RFLP in sheep from central part of Iran. Journal of Veterinary Laboratory Research. 1(1): 27-37.

42. **Ghaffar, A., Ijaz, M., Ali, A., Farooqi, S.H., Rehman, A., Ali, M.M., Zafar, M.Z. and Naeem, M.A., 2020.** First report on molecular characterization of anaplasmosis in small ruminants in Pakistan. Journal of Parasitology. 106(3): 360-368.

43. **Niaz, S., Zia Ur Rahman, I.A., Cossío-Bayúgar, R., Amaro-Estrada, I., Alanazi, A.D., Khattak, I., Zeb, J., Nasreen, N. and Khan, A., 2021.** Molecularprevalence, characterization and associated risk factors of *Anaplasma* spp. and *Theileria* spp. in small ruminants in Northern Pakistan. Parasite. 28.

44. **Renneker, S., Abdo, J., Salih, D., Karagenç, T., Bilgiç, H., Torina, A., Oliva, A., Campos, J., Kullmann, B. and Ahmed, J., 2013.** Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer? Transboundary and emerging diseases. 60: 105-112.

45. **Altay, K., Dumanli, N., Aktas, M. and Ozubek, S., 2014.** Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from East part of Turkey. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 20(1): 1-4.

46. **Zhou, M., Cao, S., Sevinc, F., Sevinc, M., Ceylan, O., Ekici, S., Jirapattharasate, C., Moumouni, P.F.A., Liu, M. and Wang, G., 2017.** Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. Ticks and tick-borne diseases. 8(2): 246-252.

47. **Amorim, L.S., Wenceslau, A.A., Carvalho, F.S., Carneiro, P.L.S. and Albuquerque, G.R., 2014.** Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 23(3): 328-336.

48. **Atif, F., Khan, M., Muhammad, F. and Ahmad, B., 2013.** Sero-epidemiological study of *Anaplasma marginale* among cattle. Journal of Animal and Plant Science. 23: 740-744.

49. **Costa, V.M.d.M., Ribeiro, M.F.B., Duarte, A.L.L., Mangueira, J.M., Pessoa, A.F.A., Azevedo, S.S., Barros, A.T.M.D., Riet-Correa, F. and Labruna, M.B., 2013.** Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 22(2): 207-213.

50. **Sharma, A., Singla, L.D., Tuli, A., Kaur, P. and Bal, M.S., 2015.** Detection and assessment of risk factors associated with natural concurrent infection of *Trypanosoma evansi* and *Anaplasma marginale* in dairy animals by duplex PCR in eastern Punjab. Tropical animal health and production. 47(1): 251-257.

Golestan province. Veterinary Researches & Biological Products. 33(4): 41-50.

23. **Noaman, V., 2018.** Molecular detection of novel genetic variants associated to *Anaplasma ovis* among dromedary camels in Iran. Archives of Razi Institute. 73(1): 11-18.

24. **Vahedi Nouri, N., Noaman, V. and Rahimabadi, E., 2020.** Molecular identification of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and sheep of Gilan province. Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal. 14(55): 263-283.

25. **Salehi-Guilandeh, S., Sadeghi-Dehkordi, Z., Sadeghi Nasab, A. and Yousefi, A., 2018.** Molecular detection of *Anaplasma spp*. in cattle of Talesh County, North of Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 22(4): 457-465.

26. **Vahedi Nouri, N. and Noaman, V., 2021.** Molecular Identification of *Anaplasma* pathogenic Species in cows in Mazandaran Province. Iranian Veterinary Journal. 17(2).

27. **Vahedi Noori, N. and Noaman, V., 2020.** Molecular Identification of *Anaplasma* pathogenic Species in Sheep in Mazandaran Province. Veterinary Researches & Biological Products. 33(2): 29-41.

28. **Noaman, V., 2020.** Epidemiological study on *Anaplasma phagocytophilum* in cattle: molecular prevalence and risk factors assessment in different ecological zones in Iran. Preventive Veterinary Medicine. 183: 105118.

29. **Ayyez, H.N., Khudhair, Y.I. and Kshash, Q.H., 2019.** Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Anaplasma* Spp. in Cattle in Al-Qadisiyah Province of Iraq. Macedonian Veterinary Review. 42(2): 181-188.

30. **Iqbal, N., Mukhtar, M.U., Yang, J., Sajid, M.S., Niu, Q., Guan, G., Liu, Z. and Yin, H., 2019.** First molecular evidence of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* in bovine from central Punjab, Pakistan. Pathogens. 8(3): 155.

31. **Aktas, M. and Özübek, S., 2015.** Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. Veterinary Microbiology. 178(3-4): 246-251.

32. **Noaman, V., Shayan, P. and Amininia, N., 2009.** Molecular Diagnostic of *Anaplasma marginale* in Carrier Cattle. Iranian Journalof Parasitology. 4: 1-2.

33. **Noaman, V. and Moradi, M., 2019.** Molecular epidemiology and risk factors assessment of *Anaplasma* spp. on dairy cattle in southwest of Iran. Acta Veterinaria Eurasia. 45(1): 30-36.

34. **Noaman, V. and 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. 163-167 .

35. **Aktas, M. and Özübek, S., 2017.** Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of Anaplasma marginale in a dairy cattle. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 54: 20-26.

36. **Aquino, A.J.B., Divina, B.P., Bombio, A.M. and Pilapil, F.M.I.R., 2018.** Detection of *Anaplasma marginale* infection in a dairy cattle farm by stained blood smear examination and nested polymerase chain reaction. Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences. 44(1): 68-75.

37. **Shaukat, A ,.Mehmood, K., Shaukat, I., Naeem, M.A., Mehfooz, A., Saleem, M.I., Sindhu, Z.U.D., Rajput, S.A., Hassan, M. and Umar, S., 2019.** Prevalence, Haematological Alterations and Chemotherapy of Bovine Anaplasmosis in Sahiwal and Crossbred Cattle of District Faisalabad, Punjab, Pakistan. Pakistan Journal of Zoology. 51(6).

38. **Ola-Fadunsin, S.D., Gimba, F.I., Abdullah, D.A., Sharma, R.S.K., Abdullah, F.J.F. and Sani, R.A., 2018.** Epidemiology and risk factors associated with *Anaplasma*