14(4) 73-80, Winter 2023

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

Original Research Paper

Molecular identification of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma marginale* in cows of Gilan province

Nasrollah Vahedi Nouri* *, Vahid Noaman, Ibrahim Rahim Abadi

Department of Parasitic Disease Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Karaj, Iran

Key Words

Molecular Identification
Anaplasma bovis
Anaplasma marginale
Gilan

Abstract

Introduction: The genus *Anaplasma* includes species of gram-negative, intracellular bacteria that can affect human and animal health. Anaplasmosis is of special economic importance in the tropical and subtropical regions of the world. These arthropod-borne bacteria all infect the blood cells of eukaryotic hosts and are located exclusively in the intracytoplasmic vacuoles of the cell. The aim of this study was molecular identification of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma marginale* species in cows of Gilan province.

Materials & Methods: This study was performed on 200 samples of cow blood collected from different parts of Gilan province during 1397. DNA was first extracted from blood samples, and using nested-PCR method, in the first stage, fragment of 1468 bp of Anaplasma16 S rRNA gene was amplified with a specific primer pair. Then, using the original PCR product, the 345 bp fragment was amplified by another specific primer pair. All positive bovine samples were examined by specific nested-PCR for the presence of *Anaplasma bovis*. Also from positive DNA extraction samples, using a pair of specific primers that amplified the 866 bp fragment of the *Anaplasma marginale* msp4 gene, reproduced.

Result: In total, 17% of cows were infected with *Anaplasma bovis* and 20% with *Anaplasma marginale*. In connection with the effect of variables: Different seasons, different ages and types of livestock on the level of livestock pollution, no significant difference was observed (P>0.05).

Conclusion: Since in Gilan province, suitable conditions are provided for the activity of most hard ticks, therefore, different species of *Anaplasma* are common in cows of Gilan province.

* Corresponding Author's email: nsvahedi@yahoo.com
Received: 23 October 2021; Reviewed: 24 November 2021; Revised: 26 January 2022; Accepted: 26 February 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.324186.2727

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی گونه‌های *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما مارژیناله* در گاوهای استان گیلان

نصرالله واحدی‌نوری*، وحید نعمان، ابراهیم رحیم آبادی

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

کلمات کلیدی

شناسایی مولکولی
آناپلاسما بوویس
آناپلاسما مارژیناله
گیلان

چکیده

مقدمه: جنس آناپلاسما، شامل گونه‌هایی از تک‌یاخته‌های، درون‌سلولی است که می‌توانند بر سلامت انسان و حیوان تأثیر بگذارند. آناپلاسموزیس، در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار هستند. این تک‌یاخته منتقله توسط بندپایان همگی سلول‌های خونی میزبان‌های یوکاریوتی را آلوده می‌کنند و منحصراً در واکوئول‌های داخل سیتوپلاسمی سلول مستقر می‌شوند. هدف این مطالعه شناسایی مولکولی گونه‌های آناپلاسما بوویس و آناپلاسما مارژیناله در گاوهای استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش، در طول سال ۱۳۹۷ روی تعداد ۲۰۰ نمونه خون جمع‌آوری‌شده از گاوهای نقاط مختلف استان گیلان انجام گردید. ابتدا DNA از نمونه‌های خون استخراج شد و با استفاده از روش nested-PCR در مرحلهٔ اول قطعه ۱٤٦۸ جفت بازی از ژن ۱٦ S rRNA جنس آناپلاسما با جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شد. سپس با استفاده از محصول PCR اولیه، قطعه ۳٤٥ جفت بازی توسط جفت پرایمری اختصاصی دیگر تکثیر شد. تمامی نمونه‌های مثبت گاوی با nested-PCR اختصاصی ازنظر وجود آناپلاسما بوویس بررسی شدند. هم‌چنین از DNA استخراجی نمونه‌های مثبت، با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی که قطعه ۸٦٦ جفت بازی از ژن msp4 آناپلاسما مارژیناله را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد.

نتایج: درمجموع ۱۷ درصد از گاوها به آناپلاسما بوویس و ۲۰ درصد به آناپلاسما مارژیناله آلوده بودند. در ارتباط با تأثیرمتغیرهای فصول مختلف سال، سنین مختلف و نوع دامداری بر میزان آلودگی دام‌ها، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردیده است (P>۰/۰٥).

بحث و نتیجه‌گیری: از آن‌جایی‌که در استان گیلان، شرایط مناسب برای فعالیت اکثر کنه‌های سخت فراهم می‌باشد، بنابراین گونه‌های مختلف آناپلاسما در گاوهای استان گیلان شایع می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nsvahedi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۳ آذر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ٦ بهمن ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۷ اسفند ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.324186.2727

مقدمه

آناپلاسموزیس یک بیماری عفونی منتقله و غیر واگیردار می‌باشد. بیماری توسط گونه‌های مختلف بیماری‌زای جنس *آناپلاسما* ایجاد می‌گردد. اگرچه بیش‌تر مطالعات به‌دلیل اهمیت اقتصادی در نشخوارکنندگان صورت گرفته است، ولی بیماری در سایر حیوانات مثل اسب، سگ و حتی انسان نیز شایع می‌باشد. گونه‌های مختلف بیماری‌زای *آناپلاسما* بسته به آلودگی نوع سلول، عوارض خود را بروز می‌دهند (۱). *آناپلاسما مارژیناله* که سبب آناپلاسموزیس کلاسیک می‌گردد، در نشخوارکنندگان تحت عنوان آناپلاسموزیس اریتروسیتی شناخته‌شده است و در صنعت گاوداری زیان‌های اقتصادی را به‌همراه دارد (۲). *آناپلاسما بوویس* ارتباط تنگاتنگی با *آناپلاسما مارژیناله* داشته اما به‌طورمعمول باعث بیماری خفیف‌تری در گاو می‌گردد (۳). انتقال بیولوژیکی از طریق کنه‌ها، رایج‌ترین راه انتقال گونه‌های بیماری‌زا ازجمله *آناپلاسما* می‌باشد (۴). گونه‌های مختلف *آناپلاسما* توسط انواع مختلف کنه منتقل می‌شوند. شایع‌ترین کنه‌های سخت ناقل جنس‌های *ایکسودس*، *درماسنتور*، *ریپی‌سفالوس*، *هیالوما* و *همافیزالیس* می‌باشند. برای آن‌که کنه‌ای آلوده شود و آلودگی را منتقل نماید، باید در زیستگاهی که پستانداران آلوده به‌عنوان مخزن *آناپلاسما* هستند، حضور داشته باشد (۵). به‌طورکلی انتقال *آناپلاسما* توسط کنه، چند ساعت پس از اتصال کنه به بدن دام شروع شده، اما ایجاد آلودگی تنها زمانی برقرار می‌گردد که کنه‌ها بیش از ۴۸ ساعت به بدن دام متصل باشند (۶). علاوه بر این، روش‌های دیگر نظیر انتقال مکانیکی از طریق گزش مگس‌های آلوده به خون برای *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* و *آناپلاسما مارژیناله* ثبت شده است (۷). میزبان‌های مخزن گونه‌های *آناپلاسما*، بسته به موقعیت جغرافیایی متفاوت بوده، اما به‌طورمعمول شامل گونه‌های نشخوارکننده وحشی می‌باشند (۸). پرندگان مهاجر نیز می‌توانند در انتقال کنه‌های آلوده به نقاط دوردست نقش مهمی داشته باشند (۹). اگرچه در میزبان‌های آلوده، نوع و شدت علائم بالینی متفاوت می‌باشد، اما گونه‌های مختلف *آناپلاسما* به لحاظ بروز علائم بالینی شباهت زیادی دارند. یکی از این علائم غیراختصاصی تب می‌باشد. بی‌اشتهایی، عدم تمایل به حرکت، کاهش تولید شیر، تنگی نفس و نهایتاً مرگ در اثر پیشرفت بیماری مشاهده می‌شود (۱۰). درمجموع نشخوارکنندگان آلوده به‌عنوان حامل و مخزن دائمی عمل می‌کنند. شدت علائم بالینی در نشخوارکنندگان با افزایش سن، افزایش می‌یابد. رایج‌ترین یافته‌های آزمایشگاهی ترومبوسیتوپنی، لوکوپنی و کم‌خونی است (۸). سابقه همه‌گیری بیماری همراه با علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی در تأیید عفونت *آناپلاسما* ضروری است (۶). بیماری معمولاً خود محدود شونده است، اما در صورت پیشرفت بیماری درمان با آنتی‌بیوتیک موردنیاز است. مهم‌ترین راه پیشگیری آناپلاسموزیس، کنترل کنه‌ها است (۸). بیماری در سرتاسر جهان و به‌خصوص در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیری و هم‌چنین معتدل گسترش دارد (۱۱). گزارش‌های متعدد، از شیوع *آناپلاسما* در کشورهای مختلف دنیا شامل مناطق استوایی و نیمه استوایی نیم‌کره جنوبی با میزان ۳۵ تا ۹۵ درصد تا مناطق نیمه گرمسیری و کشورهای حوزه مدیترانه در نیم‌کره شمالی با میزان ۲ تا ۳۰ درصد حکایت دارد (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶). در ایران نیز از سال ۲۰۰۹ تاکنون تحقیقاتی درخصوص شناسایی گونه‌های *آناپلاسما* در گاوها با روش‌های مولکولی انجام شده است و برای اولین بار گونه‌های *آناپلاسما مارژیناله*، *آناپلاسما سنترالره* سویه آموری، *آناپلاسما بوویس*، *آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم* درگاو با روش‌های مولکولی و تعیین توالی شناسایی شدند (۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). مطالعات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که فراوانی *آناپلاسما مارژیناله* در گاوهای مرکز و جنوب‌غربی کشور بیش‌تر از شمال و غرب کشور می‌باشد. هم‌چنین بین اقلیم‌های مختلف، بیش‌ترین فراوانی مربوط به منطقه بیابانی، ارتفاعات ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ متر، طول جغرافیایی ۴۸ تا ۵۰ و عرض جغرافیایی کم‌تر از ۳۰ درجه می‌باشد (۲۷). در استان‌های ساحلی دریای خزر نیز تحقیقات پراکنده‌ای صورت گرفته، به‌طوری‌که میزان آلودگی گاوهای استان مازندران به *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما مارژیناله* به‌ترتیب ۱۱/۴ درصد و ۴/۸ درصد تعیین شده است (۲۱). هم‌چنین در منطقه تالش استان گیلان نیز تحقیق محدودی انجام شده و میزان آلودگی گاوهای این منطقه به *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما مارژیناله* به‌ترتیب ۳۵/۳۳ درصد و ۹/۳۳ درصد تعیین گردیده است (۲۳). استان گیلان یکی از استان‌های مستعد برای پرورش نشخوارکنندگان، به‌خصوص گاو می‌باشد (۲۴). با توجه به اهمیت این بیماری در دام‌ها و به‌خصوص در گاو، این مطالعه جامع مولکولی برای اولین بار در گاوهای استان گیلان (۱۰ شهرستان) به جهت شناسایی دو گونه *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما مارژیناله* و تأثیر عواملی از قبیل فصل، سن و وضعیت دامداری بر میزان شیوع آن‌ها صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: این تحقیق به‌صورت مقطعی توصیفی بر روی گاوهای استان گیلان انجام گردید. برای این منظور در طول سال ۱۳۹۷، به‌صورت تصادفی از ۲۰۰ رأس گاو به‌ظاهر سالم از نقاط مختلف استان (آستانه‌اشرفیه، رشت، رودبار، رودسر، شفت، صومعه‌سرا، طوالش، فومن، لاهیجان و لنگرود) نمونه‌گیری

خون به‌عمل‌آمده است. از هر دام ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ و در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد (EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid) جمع‌آوری شد. اطلاعات مربوط به دامداری و دام‌های مورد نمونه‌گیری براساس گفته دامدار در برگه‌های جداگانه‌ای ثبت شد. نمونه‌ها در یخ زن (منهای ۲۰ درجه سلسیوس) جهت آزمایش‌های بعدی نگه‌داری گردید. برای استخراج DNA نمونه‌های خون را از یخ‌زن خارج و در دمای اتاق قرار داده، پس از ذوب، تقریباً ۵۰میکرولیتر از هر نمونه را در داخل تیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA تولیدشده در شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت، استخراج DNA انجام گرفت. سپس DNA استخراجی براساس دستورالعمل، بر روی ژل آگارز موردبررسی و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

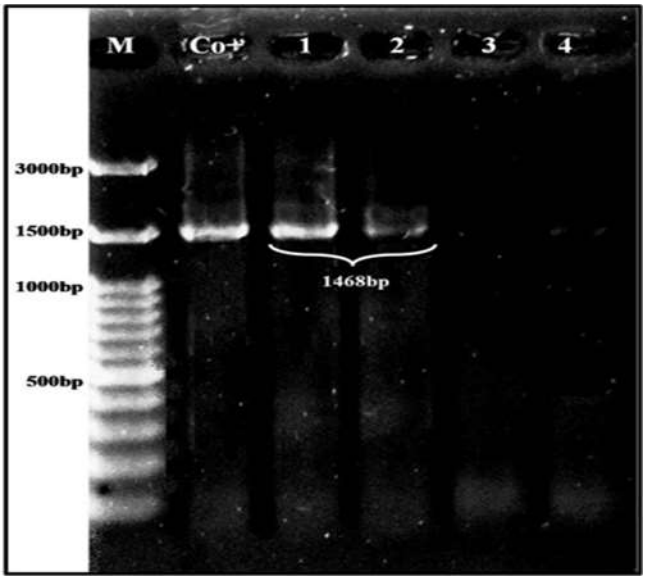
PCR و nested-PCR اولیه: PCR اولیه برای تشخیص جنس آناپلاسما بدون درنظر داشتن گونه خاصی انجام گرفت. بدین منظور از جفت پرایمر all *Anaplasma* شامل F: (5`AGAGTTTGATCC TGGCTCAG3`) و R:(5'ACAGCTACCTTGTTACGACTT3') استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن شامل تمامی گونه‌های *آناپلاسما* می‌شود. محصول تکثیر شده در اثر این جفت پرایمر پس از PCR اولیه در همه گونه‌ها در حدود ۱۴۶۸ جفت باز بوده و دربرگیرنده قطعه بسیار متغیر V1 (Hyper Variable Region) از ژن S rRNA ۱۶ جنس *آناپلاسما* است. بعد از اتمام PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز حاوی محلول 0.5x TBE و با ولتاژ ۱۰۰ آنالیز شدند. جهت تأیید قطعه تکثیرشده در PCR اولیه که توسط پرایمرهای all *Anaplasma* تکثیر شد، دو پرایمر در داخل قطعه تکثیرشده طراحی گردید. این دو پرایمر جدید اگرچه گونه خاصی از *آناپلاسما* را تکثیر نمی‌کرد و جنس *آناپلاسما* را تشخیص می‌داد ولی به جهت تأیید تشخیص DNA تکثیری در محصول اولیه و اطمینان از عدم تکثیر DNA ارگانیسم‌های دیگر و واکنش‌های مثبت و منفی کاذب ضروری بود. در قطعه تکثیری حاصل از پرایمرهای *Anaplasma*-nested-Sense (5'GGTACCTATAGAA GAAGTCC3') و *Anaplasma*-nested-Antisense (5'TAGCACT CATCGTTTACAGC3') قسمت بسیار متغیر ژن S rRNA ۱۶ نیز تکثیر می‌شود، بنابراین از قطعه مذکور نیز می‌توان در جهت تشخیص گونه استفاده نمود

Nested-PCR جهت تشخیص گونه *آناپلاسما بوویس*: برای این منظور پرایمر sense اختصاصی برای گونه‌های *آناپلاسما بوویس استفاده* شد (۲۵). با استفاده از محصول PCR اولیه (۱۴۶۸جفت باز)وبا پرایمرهای sense *Anaplasma bovis* (5'CTCGTAGCTTGC TATGAGAAC3') و Antisense *Anaplasma bovis* (5'TCTCCC GGACTCCAGTCTG3') اختصاصی آزمایش تعیین گونه برای هر نمونه انجام شد.

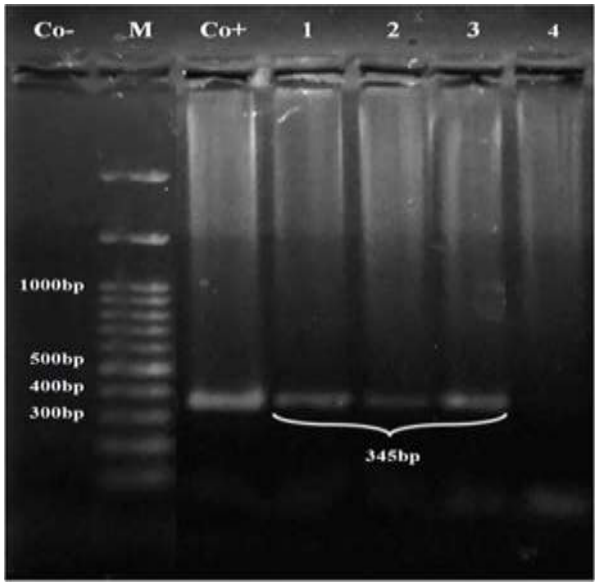
PCR جهت تکثیر گونه *آناپلاسما مارژیناله* با استفاده از ژن *msp4*: برای این منظور پرایمرهای اختصاصی طراحی شد که بتواند فقط ژن *msp4* گونه *آناپلاسما مارژیناله* را در خون گاو تکثیر نماید، بنابراین از DNA استخراجی نمونه‌های مثبت و با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی و با پرایمرهای *Anaplasma marginale* sense (5'GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC3´) و *Anaplasma marginale* Antisense (5'CCGGATCCTTAGC TGAACAGGAATCTTGC3´) اختصاصی آزمایش تعیین گونه برای هر نمونه انجام شد (۲۶). درصورتی‌که نمونه با هر جفت از پرایمرهای اختصاصی *آناپلاسما مارژیناله* تکثیر می‌شد باندی در حدود bp ۸۶۶ روی ژل مشاهده شد و گونه *آناپلاسما مارژیناله* تشخیص داده می‌شد. از نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵)، جهت مقایسه درصد فراوانی آلودگی گونه‌های *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما مارژیناله* و هم‌چنین مقایسه درصد آلودگی آن در فصول مختلف سال، سنین مختلف و نوع دامداری استفاده شد.

نتایج

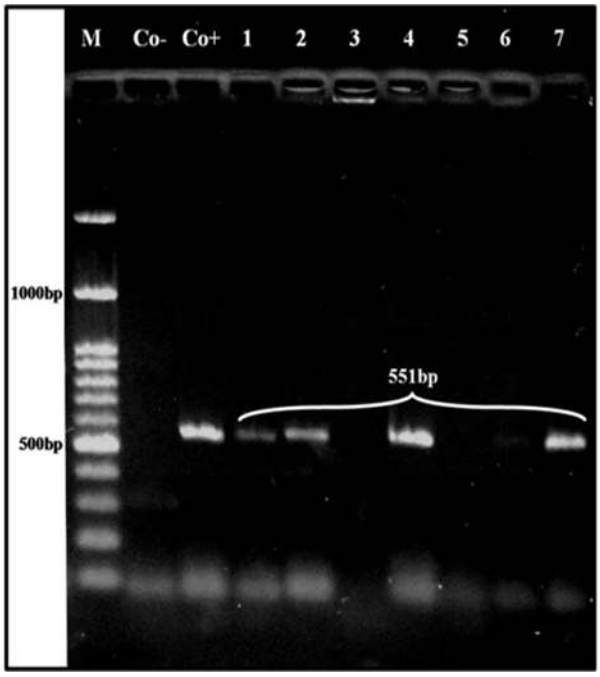
درمجموع ۳۵ درصد از نمونه‌های موردبررسی ازنظر آلودگی با جنس *آناپلاسما* مثبت بودند (شکل‌های۱و۲) (جدول ۱). هم‌چنین ۱۷ درصد نمونه‌ها، *آناپلاسما بوویس* و ۲۰ درصد نمونه‌ها *آناپلاسما مارژیناله* تشخیص داده شد (جدول ۱)(شکل‌های ۳ و ۴). براساس نتایج به‌دست آمده، درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در فصول مختلف سال، به‌ترتیب در بهار و تابستان (۱۹/۶ درصد)، پائیز و زمستان (۱۳/۶ درصد) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما بوویس* در فصول مختلف، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P<۰/۰۵)(جدول ۲). هم‌چنین درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در بین گاو و در سنین مختلف به‌ترتیب،۱-۳ سال (۱۵/۴ درصد)، ۵-۳ سال (۱۹/۵ درصد) و بالای ۵سال (۱۵/۰۲ درصد) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما بوویس* در سنین مختلف، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P<۰/۰۵) (جدول ۲). در این تحقیق درصد آلودگی گاوهای موردمطالعه به *آناپلاسما بوویس* و نوع دامداری (سنتی-نیمه‌صنعتی)، به‌ترتیب در دامداری سنتی (۱۴/۵ درصد) و نیمه‌صنعتی (۲۲/۶ درصد) به‌دست‌آمده است. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما بوویس* در ارتباط با نوع دامداری، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P<۰/۰۵)(جدول ۲).



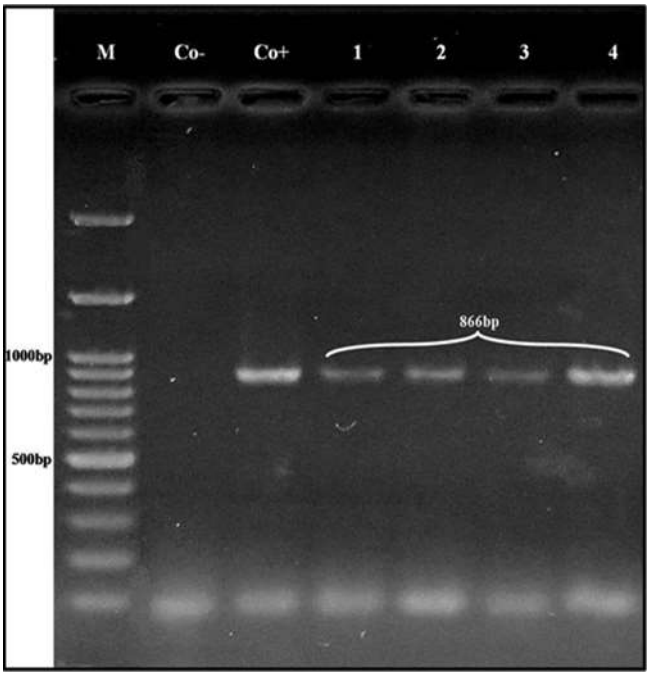
شکل ۱: الکتروفورز محصولات اولیه PCR، ۱-۴: نمونه‌های مثبت *آناپلاسما* با باندهای ۱۴۶۸، جفت باز Co^+: کنترل مثبت؛ M: مارکر ۱۰۰bp



شکل ۲: الکتروفورز محصولات Nested-PCR *Anaplasma*، ۱-۴: نمونه‌های مثبت *آناپلاسما* (جنس) با باندهای ۳۴۵ جفت باز، +Co: کنترل مثبت؛ -Co: کنترل منفی؛ M: مارکر ۱۰۰bp



شکل ۳: الکتروفورز محصولات Nested-PCR *A. bovis*، ۱، ۲، ۴ و ۷: نمونه‌های مثبت *آناپلاسما بوویس* با باند ۵۵۱ جفت باز، +Co: کنترل مثبت؛ -Co: کنترل منفی؛ M: مارکر ۱۰۰bp



شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR *A. marginale*، ۱-۴: نمونه‌های مثبت *آناپلاسما مارژیناله* با باندهای ۸۶۶ جفت باز، +Co: کنترل مثبت؛ -Co: کنترل منفی؛ M: مارکر ۱۰۰bp

براساس نتایج حاصله در این تحقیق، درصد آلودگی *آناپلاسما مارژیناله* در فصول مختلف سال، به‌ترتیب در بهار و تابستان (۱۹/۶ درصد)، پائیز و زمستان (۲۰/۵ درصد) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما مارژیناله* در فصول مختلف، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($P<0/05$) (جدول ۳). هم‌چنین درصد آلودگی *آناپلاسما مارژیناله* در سنین مختلف به‌ترتیب، ۱-۳

سال (۷/۷ درصد)، ۵-۳ سال (۲۴/۴ درصد) و بالای ۵ سال (۱۹/۶ درصد) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما مارژیناله* در سنین مختلف، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P<۰/۰۵)(جدول ۳). در بررسی آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* بر اساس نوع دامداری (سنتی-نیمه‌صنعتی)، به‌ترتیب در دامداری سنتی (۱۷/۴ درصد) و نیمه‌صنعتی (۲۵/۸ درصد) به‌دست‌آمده است. در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما مارژیناله* در ارتباط با نوع دامداری، با انجام آزمون کای‌دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P<۰/۰۵)(جدول ۳).

جدول ۱: نتایج کلی حاصله از آزمون‌های مولکولی نمونه‌های خونی گاو

نوع دام	گونه‌های *آناپلاسما*	تعداد مورد بررسی	فراوانی آلودگی (درصد)	حدود اطمینان	
				کم‌ترین (درصد)	بیش‌ترین (درصد)
گاو	*آناپلاسما*	۲۰۰	۷۰	۳۵	۲۶/۴	۴۴/۸
	آناپلاسما بوویس	۲۰۰	۳۴	۱۷	۱۰/۹	۲۵/۶
	آناپلاسما مارژیناله	۲۰۰	۴۰	۲۰	۱۳/۳	۲۸/۹

جدول ۲: آلودگی به *آناپلاسما بوویس* براساس متغیرهای موردبررسی

	متغیر	*آناپلاسما بوویس* (مثبت)		*آناپلاسما بوویس* (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	P-Value
		فراوانی	(درصد)	فراوانی	(درصد)			
فصل	بهار و تابستان	۲۲	۱۹/۶	۹۰	۸۰/۴	۱/۲۶۰	۱	۰/۲۶۲
	پائیز و زمستان	۱۲	۱۳/۶	۷۶	۸۶/۴			
سن	۳-۱ سال	۴	۱۵/۴	۲۲	۸۴/۶	۰/۶۲۲	۲	۰/۷۳۳
	۵-۳ سال	۱۶	۱۹/۵	۶۶	۸۰/۵			
	۵< سال	۱۴	۱۵/۰۲	۷۸	۸۴/۸			
نوع دامداری	سنتی	۲۰	۱۴/۵	۱۱۸	۸۸/۵	۱/۹۸۳	۱	۰/۱۵۹
	نیمه‌صنعتی	۱۴	۲۲/۶	۴۸	۷۷/۴			

* (P<۰/۰۵)

جدول ۳: آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* براساس متغیرهای مورد بررسی

	متغیر	*آناپلاسما مارژیناله* (مثبت)		*آناپلاسما مارژیناله* (منفی)		شاخص آزمون کای دو	درجه آزادی	P-Value
		فراوانی	(درصد)	فراوانی	(درصد)			
فصل	بهار و تابستان	۲۲	۱۹/۶	۹۰	۸۰/۴	۰/۰۲۰	۱	۰/۸۸۷
	پائیز و زمستان	۱۸	۲۰/۵	۷۰	۷۹/۵			
سن	۳-۱ سال	۲	۷/۷	۲۴	۹۲/۳	۳/۴۶۰	۲	۰/۱۷۷
	۵-۳ سال	۲۰	۲۴/۴	۶۲	۷۵/۶			
	۵< سال	۱۸	۱۹/۶	۷۴	۸۰/۴			
نوع دامداری	سنتی	۲۴	۱۷/۴	۱۱۴	۸۲/۶	۱/۸۹۳	۱	۰/۱۶۹
	نیمه‌صنعتی	۱۶	۲۵/۸	۴۶	۷۴/۲			

* (P<۰/۰۵)

بحث

نتایج این تحقیق حاکی از آن است که آناپلاسموزیس در گاوهای استان گیلان رایج می‌باشد. در ایران و تا قبل از سال ۲۰۰۹، تحقیقات در زمینه *آناپلاسما* در گاوها بسیار محدود بوده و عمدتاً بر مبنای روش تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا استوار بوده است (۲۷). از سال ۲۰۰۹ به بعد، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه شناسایی گونه‌های مختلف *آناپلاسما* در دام‌های کشور و به‌خصوص گاو به‌روش مولکولی و تعیین توالی ژن صورت گرفته است (۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱). براساس نتایج تحقیقات، آناپلاسموزیس در بین نشخوارکنندگان اهلی ایران شایع بوده، به‌طوری‌که درمجموع میزان متوسط شیوع *آناپلاسما* در دام‌های اهلی ایران ۳۴ درصد تخمین زده می‌شود که این میزان

در گاو، گوسفند و بز به‌ترتیب ۲۴ درصد، ۳۹ درصد و ۳۹ درصد می‌باشد (۳۱). نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق تا حدودی مشابه نتایج سایر محققان می‌باشد. در همین راستا، مطالعات بر روی گاوهای استان مازندران، میزان آلودگی *آناپلاسما* را ۲۷/۶ درصد نشان داد (۲۲). هم‌چنین با مطالعات بر روی گاوهای منطقه تالش در استان گیلان، میزان آلودگی *آناپلاسما* را ۴۰/۶۶ درصد گزارش گردید (۲۳). البته تحقیقات انجام‌گرفته در مناطق مرکزی فلات ایران (استان اصفهان) و با استفاده از روش تهیه گسترش خونی، میزان آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* در گاوها ۱۶/۷ درصد تعیین گردید (۱۸). به‌هر حال استان‌های شمالی حاشیه دریای خزر، با توجه به شرایط جغرافیایی خاص خود و برخورداری از آب‌وهوای نواحی خزری، بستر مناسبی برای فعالیت کنه‌های ناقل انواع عوامل بیماری ازجمله *آناپلاسما* به‌شمار می‌آیند. از طرف دیگر، در مقایسه با همسایگان ایران نظیر روسیه، پاکستان، ترکیه و عراق، شیوع *آناپلاسما* در ایران به‌مراتب بیش‌تر می‌باشد (۱۳، ۳۲، ۳۳، ۳۴). *آناپلاسما بوویس* موجب آناپلاسموزیس در پستانداران کوچک و نشخوارکنندگان می‌گردد. این اجرام در منوسیت‌های میزبان مستقر می‌شوند. اگرچه معمولاً دام‌های مبتلا علائمی نشان نمی‌دهند، اما در برخی از موارد تب، بی‌اشتهایی، کم‌خونی، کاهش وزن و حتی در مواردی مرگ مشاهده شده است (۳۵). میزان شیوع به نوع گونه حیوان مبتلا و روش‌های تشخیصی به‌کار گرفته شده بستگی دارد. در این تحقیق، ۱۷ درصد از گاوهای مورد مطالعه در استان گیلان، بدون این‌که هیچ‌گونه علائمی از خود نشان‌دهند، آلوده به *آناپلاسما بوویس* بودند (جدول ۱). در مقایسه با نتایج سایر محققان در نقاط مختلف کشور، این میزان آلودگی در گاوها قابل‌توجه می‌باشد. به‌طوری‌که مطالعات مولکولی بر روی گاوهای استان مازندران، میزان آلودگی به *آناپلاسما بوویس* را ۱۱/۴ درصد تعیین گردید (۲۱). هم‌چنین نتایج مطالعات بر روی گاوهای مناطق مرکزی ایران (استان اصفهان) به‌روش مولکولی، میزان شیوع *آناپلاسما بوویس* را ۲/۶۶ درصد تعیین گردید (۳۶). البته در مطالعه بر روی گاوهای منطقه طوالش استان گیلان، درصد آلودگی به *آناپلاسما بوویس* را ۳۵/۳۳ درصد تعیین شد (۲۳). آلودگی در مناطق مختلف دنیا نیز شایع بوده و میزان آن از ۳/۹۴ تا ۳۹/۸ درصد در نشخوارکنندگان و ۹ تا ۱۵درصد در گوزن‌های حیات‌وحش متغیر می‌باشد (۳۷). با توجه به شیوع بالای آلودگی *آناپلاسما بوویس* در گوسفندان و بزها در برخی از کشورهای دنیا، به‌نظر می‌رسد که این حیوانات به‌عنوان مخزن در طبیعت عمل می‌نمایند (۳۶). نظر به این‌که در فصول بهار و تابستان، شرایط محیطی برای فعالیت کنه‌های سخت ناقل انواع بیماری ازجمله گونه‌های *آناپلاسما* مهیا می‌باشد، لذا در شش ماه اول سال، میزان آلودگی در دام‌ها به‌مراتب بیش‌تر از شش ماه دوم سال است. در همین راستا و در مطالعات بر روی گاوهای استان مازندران، میزان آلودگی به *آناپلاسما بوویس* در شش ماه دوم سال را بیش‌تر از شش ماه اول سال گزارش گردید (۲۱). به‌هرحال با تحقیقات بر روی کنه‌های سخت ناقل *آناپلاسما بوویس* در هر یک از این مناطق، وضعیت آلودگی بهتر مشخص می‌گردد. با این وجود در سنین ۳ تا ۵ سال درصد آلودگی بیش‌تر از سایر سنین می‌باشد. معمولاً با افزایش سن دام و احتمال مواجهه بیش‌تر دام‌ها با ناقلین عفونت، درصد آلودگی دام‌های مسن افزایش خواهد یافت. اگرچه انتظار بر این است که میزان آلودگی در دامداری‌های سنتی بیش‌تر از دامداری‌های صنعتی و یا نیمه‌صنعتی باشد، اما نتایج عکس آن را نشان می‌دهد. دلایل این موضوع را می‌بایست در عدم رعایت موازین بهداشتی از قبیل مبارزه مدون با کنه‌های ناقل بیماری، تعویض سرسوزن، ضدعفونی جایگاه دام و غیره... دانست. آناپلاسموزیس ناشی از *آناپلاسما مارژیناله* مهم‌ترین بیماری‌های شناخته‌شده در گاوهای سراسر دنیا است. این بیماری عفونی غیرمسری با کم‌خونی همولیتیک پیش‌رونده، سقط‌جنین، کاهش تولید شیر و مرگ و میر همراه می‌باشد (۳۸). کنه *ریپی سفالوس میکروپلوس* ازجمله کنه‌های مطرح در انتقال *آناپلاسما* می‌باشد. اگرچه دیگر گونه‌های کنه نیز در انتقال آن نقش دارند. انتقال مکانیکی از طریق سرسوزن‌های آلوده، وسایل جراحی آلوده و گاز گرفتن حیوانات آلوده نیز رخ می‌دهد. هم کنه و هم حیوانات آلوده به‌عنوان مخزن عامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). در این تحقیق ۲۰ درصد از گاوهای مورد مطالعه در استان گیلان، بدون این‌که هیچ‌گونه علائمی از خود نشان دهند، آلوده به *آناپلاسما مارژیناله* بودند (جدول ۱). این مطالعه، به‌عنوان اولین مطالعه کامل و جامع از وضعیت آلودگی گاوهای استان گیلان به *آناپلاسما مارژیناله* بود. در مقایسه با نتایج تحقیقات سایر محققان در کشور، این میزان قابل‌توجه می‌باشد. نتایج مطالعات بر روی گاوهای منطقه طوالش استان گیلان، درصد آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* را ۹/۳۳ درصد نشان داد (۲۳). در همین راستا، مطالعات مولکولی بر روی گاوهای استان مازندران، میزان آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* ۴/۸درصد تعیین گردید (۲۳). براساس تحقیقات به‌عمل‌آمده، فراوانی *آناپلاسما مارژیناله* در گاو، در مرکز و جنوب‌غربی ایران بیش‌تر از شمال و غرب کشور می‌باشد (۳۹). در نقاط مختلف دنیا نیز، درصد آلودگی گاوها به *آناپلاسما مارژیناله* متفاوت گزارش‌شده است. در مصر، به‌روش مولکولی، میزان آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* در گاوها ۶۸/۳ درصد تعیین گردید (۴۰). نتایج تحقیقات بر روی ۳۲۸ نمونه‌خون جمع‌آوری شده از ۸۰ واحد پرورش دام واقع در چهار منطقه زیست اقلیمی کشور تونس، نشان داد که ۲۴/۷ درصد از گاوها آلوده به *آناپلاسما*

مارژیناله بودند (۱۰). در همین راستا و تحقیقاتی در مصر، به لحاظ میزان آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* بین فصول گرم و فصول سرد سال، نیز تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید (۴۰). براساس این نتایج، با افزایش سن دام، میزان آلودگی افزایش‌یافته است. سن دام یک فاکتور تأثیرگذار بر میزان شیوع آلودگی به گونه‌های مختلف *آناپلاسما* به‌شمار می‌آید، به‌طوری‌که حیوانات مسن‌تر، بیش‌تر از حیوانات جوان‌تر به بیماری مبتلا می‌گردند. نتایج تحقیقی در میان گاوهای منطقه جنوب کوئینزلند، این موضوع را تأیید می‌نماید (۴۱). برعکس، مطالعه‌ای در پاکستان، تأثیر سن بر میزان آلودگی را رد می‌نماید (۴۲) از طرف دیگر، تحقیقاتی در برزیل نشان داد که حیوانات زیر ۶ ماه، حساس‌تر از حیوانات مسن هستند (۴۳). به‌هر حال این موضوع نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد. اگرچه انتظار بر این است که میزان آلودگی در دامداری‌های سنتی بیشتر از دامداری‌های صنعتی و یا نیمه‌صنعتی باشد، اما نتایج عکس آن را نشان می‌دهد. دلایل این موضوع را می‌بایست در عدم رعایت موازین بهداشتی از قبیل مبارزه مدون با کنه‌های ناقل بیماری، تعویض سرسوزن، ضدعفونی جایگاه دام و غیره دانست (۴۴، ۴۵). آناپلاسموزیس از بیماری‌های رایج در گاوهای استان گیلان می‌باشد. با توجه به این که نتایج به‌دست آمده در این تحقیق در مورد گاوهای بوده که هیچ‌گونه علائمی بالینی از خود نشان نمی‌دادند، این موضوع بسیار بااهمیت می‌باشد زیرا این دسته از گاوها می‌توانند به‌عنوان یک مخزن بالقوه در انتقال عامل بیماری به دام‌های سالم باشند. بنابراین کنترل آلودگی از طریق کنترل کنه‌های ناقل از اهمیت ویژه برخوردار می‌باشد.

منابع

1. **Parham, P.E., Waldock, J., Christophides, G.K., Hemming, D., Agusto, F., Evans, K.J., Fefferman, N., Gaff, H., Gumel, A., LaDeau, S. and Lenhart, S., 2015.** Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 370(1665): 20130551.
2. **Mullen, G.R. and Durden, L.A., 2009.** Editors. Medical and veterinary entomology. Academic press.
3. **Seo, M.G., Ouh, I.O., Lee, H., Geraldino, P.J.L., Rhee, M.H., Kwon, O.D. and Kwak, D., 2018.** Differential identification of Anaplasma in cattle and potential of cattle to serve as reservoirs of *Anaplasma capra*, an emerging tick-borne zoonotic pathogen. Veterinary microbiology. 226: 15-22.
4. **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)
5. **Fourie, J.J., Evans, A., Labuschagne, M., Crafford, D., Madder, M., Pollmeier, M. and Schunack, B., 2019.** Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) by *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) ticks feeding on dogs and artificial membranes. Parasites & vectors. 12(1): 1-10.
6. **Vickers, N.J., 2017.** Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? Current biology. 27(14): 13-15.
7. **Štefanidesová, K., Škultéty, Ľ., Sparagano, O.A. and Špitalská, E., 2017.** The repellent efficacy of eleven essential oils against adult *Dermacentor reticulatus* ticks. Ticks and tick-borne diseases. 8(5): 780-786.
8. **Karlsen, A., Vojtek, B., Mojžišová, J., Prokeš, M. and Drážovská, M., 2020.** Anaplasmosis in Animals. Folia. Veterinaria. 64: 17-26.
9. **Razanske, I., Rosef, O., Radzijevskaja, J., Bratchikov, M., Griciuviene, L. and Paulauskas, A., 2019.** Prevalence and co-infection with tick-borne *Anaplasma phagocyte philum* and *Babesia* spp. in red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Southern Norway. International journal for parasitology: parasites and wildlife. 8: 127-134.
10. **M'ghirbi, Y., Bèji, M., Oporto, B., Khrouf, F., Hurtado, A. and Bouattour, A., 2016.** *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in cattle in Tunisia. Parasites & vectors. 9(1): 1-8.
11. **Hairgrove, T., Schroeder, M.E., Budke, C.M., Rodgers, S., Chung, C., Ueti, M.W. and Bounpheng, M.A., 2015.** Molecular and serological in-herd prevalence of Anaplasma marginale infection in Texas cattle. Preventive Veterinary Medicine. 119(1-2): 1-9.
12. **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: 328-336.
13. **Hamou, S.A., Rahali, T., Sahibi, H., Belghyti, D., Losson, B., Goff, W. and Rhalem, A., 2012.** Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle of North Central Morocco. Research in veterinary science. 93(3): 1318-1323.
14. **Masuzawa, T., Uchishima, Y., Fukui, T., Okamoto, Y., Pan, M.J., Kadosaka, T. and Takada, N., 2014.** Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* in small wild mammals from Taichung and Kinmen Island, Taiwan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 67(2): 111-114.
15. **Mutshembele, A.M., Cabezas-Cruz, A., Mtshali, M.S., Thekisoe, O.M., Galindo, R.C. and de la Fuente, J., 2014.** Epidemiology and evolution of the genetic variability of Anaplasma marginale in South Africa. Ticks and tick-borne diseases. 5(6): 624-631.
16. **Nair, A.S., Ravindran, R., Lakshmanan, B., Sreekumar, C., Kumar, S.S., Raju, R., Tresamol, P.V., Vimalkumar, M.B. and Saseendranath, M.R., 2013.** Bovine carriers of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma bovis* in South India.Trop Biomed. 30(1): 105-112.
17. **Noaman, V., 2019.** A review on *Anaplasma phagocytophilum* as a zoonotic agent. Tehran University Medical Journal TUMS Publications. 76(12): 778-785.
18. **Noaman, V., Arabzadeh, S. and Kachouei, B., 2001.** A study on anaplasmosis in cattle of falavarjan city, Isfahan province (1995-2000). Veterinary Researches & Biological Products. 14(3): 10-13.
19. **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. 46(1): 30-37.

molecular survey and novel genetic variants' identification of *Anaplasma marginale, A. centrale* and *A. bovis* in cattle from Tunisia. Infection, Genetics and Evolution. 34: 361-371.

36. **Noaman, V. and Shayan, P., 2010.** January. Molecular detection of *Anaplasma bovis* in cattle from central part of Iran. Veterinary Research Forum. 1(2): 117-122.

37. **Said, M.B., Belkahia, H., Karaoud, M., Bousrih, M., Yahiaoui, M., Daaloul-Jedidi, M. and Messadi, L., 2015.** First molecular survey of *Anaplasma bovis* in small ruminants from Tunisia.Veterinary microbiology. 179(3-4): 322-326.

38. **El-Ashker, M., Hotzel, H., Gwida, M., El-Beskawy, M., Silaghi, C. and Tomaso, H., 2015.** Molecular biological identification of *Babesia, Theileria,* and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. Veterinary parasitology. 207(3-4): 329-334.

39. **Noaman, V., Adami-Dehkordi, P. and Shojaei, S.S.R., 2021.** Comparison of microscopic and molecular methods in the diagnosis of *Anaplasma marginale* and determination of related risk factors in cattle in Semnan province. Veterinary Research and Biological Products. 34(4): 136-146.

40. **Al-Hosary, A., Răileanu, C., Tauchmann, O., Fischer, S., Nijhof, A.M. and Silaghi, C., 2020.** Epidemiology and genotyping of Anaplasma marginale and co-infection with piroplasms and other Anaplasmataceae in cattle and buffaloes from Egypt. Parasites & Vectors. 13(1): 1-11.

41. **Rogers, R.J., Blight, G.W. and Knott, S.G., 1978.** A study of the epidemiology of Anaplasma marginale infections of cattle in southern Queensland: clinical disease and the prevalence of complement fixing antibodies. Australian veterinary journal. 54(3): 115-120.

42. **Rafique, N., Kakar, A., Iqbal, A., Masood, Z., Razzaq, W. and Iqbal, F., 2015.** Impact assessment of tick species, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on the milk productions of cattle's in the Quetta City of Province Balochistan, Pakistan. Global Veterinaria. 15: 19-23.

43. **Vieira, L.L., Canever, M.F., Cardozo, L.L., Cardoso, C.P., Herkenhoff, M.E., Neto, A.T., Vogel, C.I.G. and Miletti, L.C., 2019.** Prevalence of *Anaplasma marginale, Babesia bovis, and Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. Parasite epidemiology and control. 6: e00114.

44. **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): 1-11.

45. **Noaman, V. and Beiranvand, M.H., 2022.** Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilium* in cattle in Lorestan province, Iran. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 73(3): 4365-4372.

20. **Noaman, V. and Shayan, P., 2009.** Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in carrier cattle of Iran-first documented report. 1(2): 37-42.

21. **Vahedi Nouri, N. and Noaman, V., 2021.** Molecular Identification of *Anaplasma* pathogenic Species in cows in Mazandaran Province. *Iranian* Veterinary Journal. 17(2): 125-139.

22. **Pazhoom, F., Ebrahimzade, E., Shayan, P. and Nabian, S., 2016.** *Anaplasma spp.* identification in hard ticks of Iran: First report of *Anaplasma bovis* in *Haemaphysalis inermis*. Acarologia. 56(4): 497-504.

23. **Salehi-Guilandeh, S., Sadeghi-Dehkordi, Z., Sadeghi-Nasab, A. and Yousefi, A., 2019.** Molecular detection of Anaplasma spp. in cattle of Talesh County, North of Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 22(4): 457-465.

24. **Seidavi, A.R., Ghanipoor, M., Mirmahdavi, S.A., Hosseinpoor, R. and Ghorbani, A., 2016.** Estimation and Comparison of Economic Values for Productive Characters in Hybrid and Native Cattles of Guilan Province. Journal of Animal Environment. 7(4): 49-58. (In Persian)

25. **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 and ticks on two major islands in Japan. Applied and environmental microbiology. 72(2): 1102-1109.

26. **de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Garcia-Garcia, J.C., Rodríguez, S.D., García, M.A., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Blouin, E.F. and Kocan, K.M., 2002.** Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Veterinary microbiology. 88(3): 275-285.

27. **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.

28. **Noaman, V., 2013.** Report of *Anaplasma centrale* (Amori strain) in cattle in Iran. Veterinary Researches & Biological Products. 26(1): 26-29.

29. **Noaman, V., Allameh, S.K. and Nabavi, R., 2017.** Anaplasmosis in ruminants of Iran: An overview. *Advanced* Techniques in *Clinical Microbiology*. 1(2): 13-16.

30. **Noaman, V., Shayan, P. and Aminina, N., 2009.** Molecular diagnostic of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. Iranian Journal of Parasitology. 4(1): 26-33.

31. **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. 11: e00173.

32. **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.

33. **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.

34. **Atif, F.A., 2012.** Prevalence of tick-borne diseases in Punjab (Pakistan) and hematological profile of *Anaplasma marginale* infection in indigenous and crossbred cattle. Pakistan Journal of Science. 64 (1).

35. **Belkahia, H., Said, M.B., Alberti, A., Abdi, K., Issaoui, Z., Hattab, D., Gharbi, M. and Messadi, L., 2015.** First