DOI:10.22092/VJ.2020.351928.1773 شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

مقایسه روش های میکروسکوپیک و ملکولی در تشخیص آناپلاسما مارجیناله و تعیین عوامل خطر مرتبط در گاوهای استان سمنان

• **وحید نعمان (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیقات بیماریهاي انگلي، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازي رازي، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران

• **پیمان آدمي دهکردي**
گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

• **سید شاپور رضا شجاعي**
گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۹-۰۶-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۱۰-۰۸-۱۳۹۹

Email: vnoaman@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین شیوع آناپلاسما مارجیناله در جمعیت گاوهای سنتی و نیمه‌صنعتی استان سمنان بود. در مجموع تعداد ۲۰۸ نمونه خون از طریق رگ گوش و رگ وداج گاوهاي به‌ظاهر سالم به‌طور تصادفی به ترتیب براي آزمون میکروسکوپي و ملکولی اخذ شد. DNA استخراجی از نمونه‌های خونی با جفت آغازگری که قطعه حدود ۸۶۶ جفت بازی از ژن *msp4* آناپلاسما مارجیناله را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد و ۴۵/۲ درصد از نمونه‌ها از نظر آناپلاسما مارجیناله مثبت تشخیص داده شدند. آزمون مربع کای جهت مقایسه میزان شیوع نسبت به اقلیم، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایي، عرض جغرافیایي، فصل، نوع دامداري از نظر مدیریت، سطح بهداشت دامداري، ناقلین موجود در دامداري، تراکم گله سن، جنس، تولید شیر انجام شد. در آزمون لجستیک چند متغیره عرض جغرافیایي، نوع دامداري از نظر مدیریت، ناقلین موجود در دامداري، سن و تولید شیر عوامل خطر مهم برای ابتلا به آناپلاسما مارجیناله معرفی شدند (P<۰,۰۵). در مقایسه با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگي آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۳۱/۹ و ۵۴/۴ درصد تعیین گردید. محاسبه ضریب کاپا بین آزمون ملکولي و میکروسکوپي آناپلاسما مارجیناله (۵۰ فیلد) نشان‌دهنده سطح ناچیز توافق دو آزمون بود (Kappa =۰,۱۳). این مطالعه اولین مطالعه تشخیص ملکولی آناپلاسما مارجیناله در گاوهای استان سمنان است. تحقیقات دیگری در جهت شناسایی ناقلین، اثر متقابل میزبان- ناقل و شناسایی واریته های ژنتیکی که ممکن است حضور و گسترش گونه‌های آناپلاسما را در گاوهای استان سمنان تحت تأثیر قرار دهند موردنیاز است.

کلمات کلیدی: آناپلاسما مارجیناله، گاو، تشخیص میکروسکوپیک و ملکولی، استان سمنان، ایران

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 136-146

Comparison of microscopic and molecular methods in the diagnosis of *Anaplasma marginale* and determination of related risk factors in cattle in Semnan province

By: Noaman, V., (Corresponding Author) Department of Parasitic Disease Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Adami-Dehkordi, P., Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. and Shojaei, S. Sh. R., Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received: 2020-09-19 **Accepted: 2020-10-31**

Email: vnoaman@gmail.com

This study aimed to determine the molecular prevalence of *Anaplasma marginale* among cattle of Semnan province. A total of 208 blood samples were randomly collected via the ear vein and jugular vein from healthy cattle for microscopy and molecular examination, respectively. The extracted DNA from blood cells was amplified by a pair of primer, which amplify an approximately 866bp DNA fragment from the region of the *msp4* gene of *A. marginale* and 45.2% of cattle blood samples were identified positive for *A. marginale*. Chi-square tests were used to compare molecular prevalence values relative to climate, altitude, longitude, latitude, season, farm-type, hygiene of the farm, vectors, farm density, age, sex, and milk yield. The significant major risk factors of *A. marginale* in cattle were identified as latitude, farm-type, vectors, age, and milk yield by the multivariable logistic regression analysis ($P< 0.05$). The examination of 50 microscopic fields showed 31.9% sensitivity and 54.4% specificity compared to molecular examination. The Kappa coefficient between molecular and microscopy (50 fields) techniques indicated a slight level of agreement (Kappa= 0.13). This study is the first molecular detection of *A. marginale* from cattle in Semnan province, Iran. Further researches are needed to determine the vectors, vector-host interactions, and genotypic variants that may affect the presence and distribution of Anaplasma species in Semnan province.

Key words: *Anaplasma marginale*, Cattle, Microscopic and molecular detection, Semnan province, Iran

مقدمه

آناپلاسموزیس یکی از بیماری‌های منتقله از طریق بندپایان می‌باشد که توسط جنس آناپلاسما (*Anaplasma*) ایجاد می‌شود (۶). از نظر تاکسونومی آناپلاسما در خانواده آناپلاسماتاسه آ (Anaplasmataceae) و راسته ریکتزیاله (Rickettsiale) طبقه‌بندی می‌شود (۱۵). جنس آناپلاسما از نظر دامپزشکی و پزشکی واجد اهمیت است. گونه‌های این جنس که در نشخوارکنندگان ایران شناسایی‌شده‌اند عبارت‌اند از: آناپلاسما مارجیناله (*A. marginale*)، آناپلاسما سنتراله (*A. centrale*)، آناپلاسما اوویس (*A. ovis*)، آناپلاسما بوویس (*A. bovis*)، آناپلاسما فاگوسیتوفیلم (*A. phagocytophilum*) (گونه مشترک بین انسان و دام) (۲۳, ۲۴, ۲۶, ۲۷, ۳۱, ۳۴). آناپلاسما مارجیناله مهم‌ترین عامل آناپلاسموزیس گاوی است که توسط بندپایان منتقل می‌شود و از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در شش قاره جهان در نظر گرفته می‌شود (۷). بیماری در گاو علائم بالینی مشخص از جمله تب، بی‌اشتهایی، خمودگی، لاغری، کم‌خونی خفیف تا شدید، زردی بدون ظهور هموگلوبین در خون و ادرار، کاهش وزن، سقط و مرگ ایجاد می‌نماید (۴۰).

در گاوهاي بهبود يافته از آناپلاسموزيس حاد عفونت پايدار ايجاد مي‌شود و سطح ارگانيسم در حدي نيست كه به روش ميكروسكوپيک قابلتشخيص باشد. در اين گاوها (حامل) سيستم دفاعي بدن بر ارگانيسم غلبه مي‌كند و تراكم گلبول‌هاي آلوده به حداقل ممكن مي‌رسد بطوري كه علائم بيماري نشان داده نمي‌شود. در مواردي كه حيوان آلوده ضعيف شده و قدرت دفاعي بدن كم شود ارگانيسم تكثير نموده و تعداد زيادي از گلبول‌هاي قرمز را آلوده كرده و علائم و نشانه‌هاي آناپلاسموزيس حاد به نحو مشخص ظاهر مي‌شود. به هرحال گاوهايي كه آلودگي دائمي دارند به عنوان مخزن آناپلاسما مارجيناله عمل مي‌كنند زيرا اين حيوانات منبع آلودگي خوني براي انتقال مكانيكي و بيولوژيكي عامل بيماري توسط كنه‌ها مي‌باشند (۲۰, ۲۵). انتقال آناپلاسما مارجيناله عمدتاً به صورت بيولوژيک توسط كنه‌ها انجام مي‌شود. انتقال مكانيكي از طريق وسايل آلوده به خون و توسط دو بالان جنس تابانوس (*Tabanus*)، استوموكسيس (*Stomoxys*)، پشه ها از جنس پزوروفورا (*Psorophora*) و شپش‌ها از جنس هماتوپينوس (*Haematopinus*) گزارش شده است (۱۱, ۱۷, ۱۸, ۳۷, ۴۳, ۴۴).

علاوه بر انتقال مکانیکی و بیولوژیکی، آناپلاسما مارجیناله می‌تواند از گاو به گوساله از طریق جفت در طول آبستنی منتقل شود (۱۹). مشاهده آناپلاسما در داخل گلبول قرمز در گسترش خوني رنگ‌آمیزی شده با گیمسا معمول‌ترین وسیله تشخیص در گاوهایي است که علائم باليني دارند ولی باید مراقب بود که ذرات رنگ و اجسام هاول جولی بادی (Howell jolly body) با آناپلاسما اشتباه نشود. پس از رنگ‌آمیزی با یکی از روش‌های رومانوسکی، آناپلاسما مارجیناله در درون گویچه‌های قرمز با ساختمان همگن و گرد به قطر ۰/۳ تا ۱ میکرون به رنگ آبی ارغوانی دیده می‌شود. تشخیص زمانی دارای اعتبار است که توسط فردي ماهر و در گسترش‌های مناسب و با رنگ‌آمیزی خوب انجام شود (۲۲). این روش ممکن است در گاوهاي بدون علامت و حامل نتایج قابل قبولي نداشته باشد (۳۲). آزمون‌های سرولوژی متفاوتی در مطالعات همه‌گیرشناسی آناپلاسموزیس در کشورهای مختلف استفاده شده‌اند در اکثر این روش‌ها واکنش متقاطع گونه‌های آناپلاسما قابل‌تفریق نیست و علاوه بر این، نتایج منفی و مثبت کاذب نیز عموماً در این آزمون‌ها مشاهده می‌شود. از طرفی روش‌های سرمی در شناسایي دام‌های آلوده در فاز اولیه عفونت و عفونت‌های مزمن با تعداد پایین انگل در خون محدودیت دارند (۱۰). شناسایی گاوهای حامل آناپلاسما مارجیناله اهمیت خاصی در کنترل و پیشگیری بیماری دارد زیرا این دام‌ها به عنوان مخزن، در انتقال آلودگی به دام‌های حساس بسیار اهمیت دارند. تحقیقات اخیر، حساسیت و ویژگی بالاتر روش‌های ملکولی را در شناسایی انگل‌های خونی نسبت به روش‌های سرولوژیکی و میکروسکوپی نشان داده‌اند. روش‌های مولکولی همچون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) علاوه بر تشخیص دقیق گونه‌ها تمایز گونه‌ای را نیز امکان‌پذیر ساخته‌اند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تشخیص آلودگی به گونه‌های آناپلاسما، ۴۰۰۰ برابر حساس‌تر از تشخیص میکروسکوپیک است (۱۶). حساسیت و ویژگی بالای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سبب شده است که این روش برای تأیید نتایج حاصل از آزمون‌های تشخیصی دیگر و تأیید سلامت حیوان برای صادرات، به‌کاربرده شود (۹). در گذشته مطالعات انجام‌شده در خصوص شناسایی آناپلاسما مارجیناله و آناپلاسموزیس در ایران عمدتاً بر اساس مشاهدات میکروسکوپی و شناسایی انگل در گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده بوده است (۲۸, ۳۹). در بررسی‌های انجام‌شده در سال‌های اخیر آناپلاسما مارجیناله در گاوهای استان‌های اصفهان، خوزستان و آذربایجان غربی با روش‌های ملکولی و میکروسکوپی شناسایی‌شده است (۲۹, ۳۰, ۳۳). از آنجاکه اطلاعات ناچیزي در خصوص شیوع آناپلاسما مارجیناله در جمعیت گاوهاي استان سمنان در دست است و در سال‌های اخیر موارد متعددی از آناپلاسما مارجیناله در گسترش‌های خونی تهیه‌شده از گاوهای مشکوک به انگل‌های خونی توسط آزمایشگاه‌های دامپزشکی استان سمنان گزارش‌شده بود لذا این تحقیق باهدف مطالعه ملکولی آناپلاسما مارجیناله در جمعیت گاوهای سنتی و نیمه‌صنعتی استان سمنان و شناسایي برخي از عوامل خطر و مقایسه دو روش ملکولی و مشاهده میکروسکوپی در شناسایی آناپلاسما مارجیناله در جمعیت موردنظر انجام گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۲۰۸ گاو در گاوداری‌های نیمه‌صنعتی و سنتی استان سمنان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. نمونه‌گیری به صورت تصادفي از ۴۰ گاوداری سنتی و نیمه‌صنعتی انجام و از هر دامداری حداقل از پنج گاو نمونه‌برداری انجام شد. از هر گاو یک گسترش خونی از ورید گوش و دو میلی‌لیتر خون از ورید وداج در لوله حاوی ماده ضد انعقاد و همچنین پرسشنامه‌ای برای هر نمونه اخذ شد و نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی و بیولوژي ملکولي تحویل شدند. در هر مورد بازدید و نمونه‌گیری اطلاعاتي شامل نام دامدار، روستا/منطقه، تعداد دام، کد دام، اقلیم، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایي، عرض جغرافیایي، فصل (سرد، گرم)، نوع دامداري از نظر مدیریت (به دامداری‌هایی که اصول علمي به‌طور نسبي در ساخت‌وساز ساختمان‌ها و تأسیسات آن‌ها اعمال‌شده و داراي ماشین‌آلات و تجهیزات در حد رفع نیازهاي اساسي خود می‌باشند دامداري نیمه‌صنعتی و به دامداری‌هایی که بدون اصول علم دام‌پروری در داخل و حاشیه روستا احداث گردیده‌اند دامداري سنتي گویند) بر اساس مستندات مدیریت امور دام جهاد کشاورزي استان سمنان (نیمه‌صنعتی، سنتي)، سطح بهداشتي دامداري (شامل بهداشت جایگاه، بهداشت شیردوشي و پستان، بهداشت زایشگاه و زایمان، بهداشت گوساله داني، بهداشت انبار علوفه، بهداشت آب، انجام برنامه‌های کنترل و پیشگیري از بیماری‌های عفوني و انگلي) بر اساس مستندات و ضوابط اداره کل دامپزشکي استان سمنان (بالا، پایین)، ناقلین بندپا در دامداري (مگس‌های خون‌خوار، کنه) بر اساس مشاهده و گفته دامدار، تراکم گله بر اساس تعداد دام به مترمربع فضاي دامداري (پایین، بالا)، سن دام بر اساس گفته دامدار (کمتر از ۳ سال، بیش از ۳ سال)، جنس دام بر اساس مشاهده (نر، ماده)، وضعیت تولید شیر بر اساس گفته دام‌دار (بالا:۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم در روز، پایین: کمتر از ۱۰ کیلوگرم در روز، معمولي: بین ۱۰ تا ۲۰ کیلوگرم در روز) در فرم مربوطه ثبت و شماره فرم بر روی کلیه لوله‌ها و گسترش‌ها درج می‌شد. نژاد دام‌های نمونه‌گیری شده دو رگ و تغذیه در همه دامداری‌ها داخل دامداري انجام می‌شد. بر اساس گفته دامداران در کلیه دامداری‌ها سم‌پاشی علیه بندپایان، واکسیناسیون هاي معمول و تعویض سر سوزن در هر تزریق انجام می‌شد. دامداری‌های مورد نمونه‌گیری تا دامداری‌های دیگر زیر یك کیلومتر فاصله داشتند و گاوها ارتباطي با نشخوارکنندگان وحشي نداشتند.

بررسی گسترش‌های خونی با استفاده از میکروسکوپ نوری

ابتدا گسترش‌های خونی از پیش تهیه‌شده با متانول ثابت و به مدت ۲۰ دقیقه با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. جهت شناسایی آناپلاسما مارجیناله گلبول‌های قرمز ۵۰ فیلد میکروسکوپی از بخش‌های نازک گسترش‌های خونی با عدسی شیئی ۱۰۰ مورد جست‌وجو قرار گرفت (۳۵).

استخراج DNA از خون

استخراج DNA به منظور به دست آوردن ماده ژنتیکی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام می‌شود. در این تحقیق از کیت استخراج DNA از خون و بافت شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل

سازنده استخراج DNA انجام گرفت. جهت تعیین میزان و خلوص DNA استخراجي، چگالی نوری محصول موردنظر با استفاده از اسپکتروفتومتر و با طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابي قرار گرفت، علاوه بر این DNA استخراجي بر روي ژل آگارز مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت (۳۲).

واکنش زنجیره پلیمراز

در این تحقیق برای شناسایی آناپلاسما مارجیناله از دو آغازگر روبه‌جلو MSP45 (5'GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC3') و معکوس MSP43 -(5'CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCT TGC'3) از ژن *msp4* که قطعه‌ای در حدود ۸۶۶ جفت بازي را تکثیر می‌کردند استفاده شد (۱۴). کلیه واکنش‌ها در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری و در حجم ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر انجام شد: ۲/۵ میکرولیتر بافر(X10) PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلي مولار) با غلظت نهایي ۱/۵ میلي مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلي مولار) با غلظت نهایي ۰/۲ میلي مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر روبه‌جلو (۲۰ میکرو مولار) با غلظت نهایي ۰/۴ میکرو مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس (۲۰ میکرو مولار) با غلظت نهایي ۰/۴ میکرو مولار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (۵U/ µL) با غلظت نهایي ۰/۶۲۵ واحد در ۲۵ میکرولیتر، 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 تي-۱۰۰، ساخت آمریکا) در ۴۰ چرخه با برنامه دمایي زیر منتقل شد: انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوره شدن دو رشته‌ی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال DNA در دمای ۶۰ 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 به مدت ۱۰ دقیقه. پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. در مرحله آخر برای مشاهده باندها در سطح ژل، ژل به مدت ۲۰ دقیقه با رعایت تمام پروتوکل‌هاي ایمني در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده شد و پس از شست و شوی با آب مقطر برای نمایان شدن باندها و عکس‌برداری در دستگاه تابنده اشعه فرابنفش (ژل داکیومنتیشن) قرار گرفت.

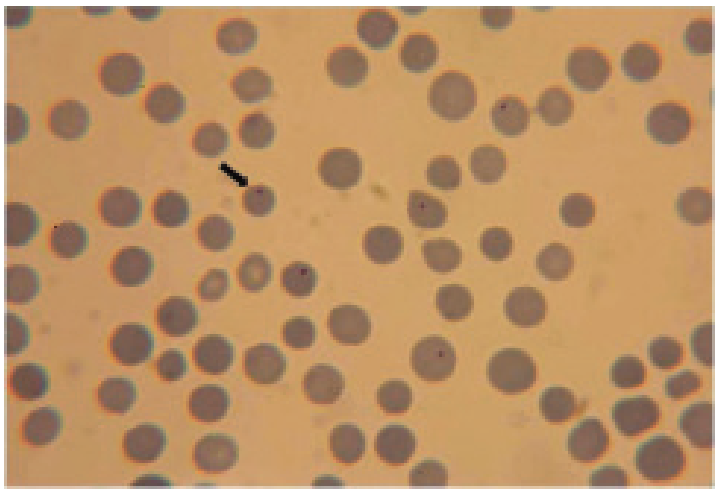
محاسبات آماری

نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش هجدهم تجزیه تحلیل آماری شدند. 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. سپس عواملی را که به‌طور نسبی (P<۰,۱۶) در آنالیز رگرسیون تک متغیره بر شیوع آناپلاسما مارجیناله مؤثر بودند را مشخص نموده و به منظور حذف متغیرهاي احتمالی مخدوش‌کننده، آن‌ها را به‌طور هم‌زمان در یک مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره وارد نموده و به شناسایی مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر شیوع آناپلاسما مارجیناله مبادرت شد. α =۰,۰۵ مبنای قضاوت آماری در نظر گرفته شد. علاوه بر این حساسیت و ویژگي آزمون میکروسکوپي نسبت به آزمون ملکولي محاسبه شد و ضریب کاپا در خصوص تطابق دو آزمون محاسبه گردید.

نتایج

در مجموع از ۲۰۸ گسترش خوني بررسی‌شده با میکروسکوپ نوري ۸۲ (۳۹/۴٪) نمونه از نظر حضور آناپلاسما مارجیناله مثبت تشخیص

شکل ۱- گلبول قرمز گاو حاوي گنجیدگي آناپلاسما مارجیناله **(فلش). گسترش خوني رنگ‌آمیزی شده با گیمسا (بزرگنمایي ۱۰۰۰).**

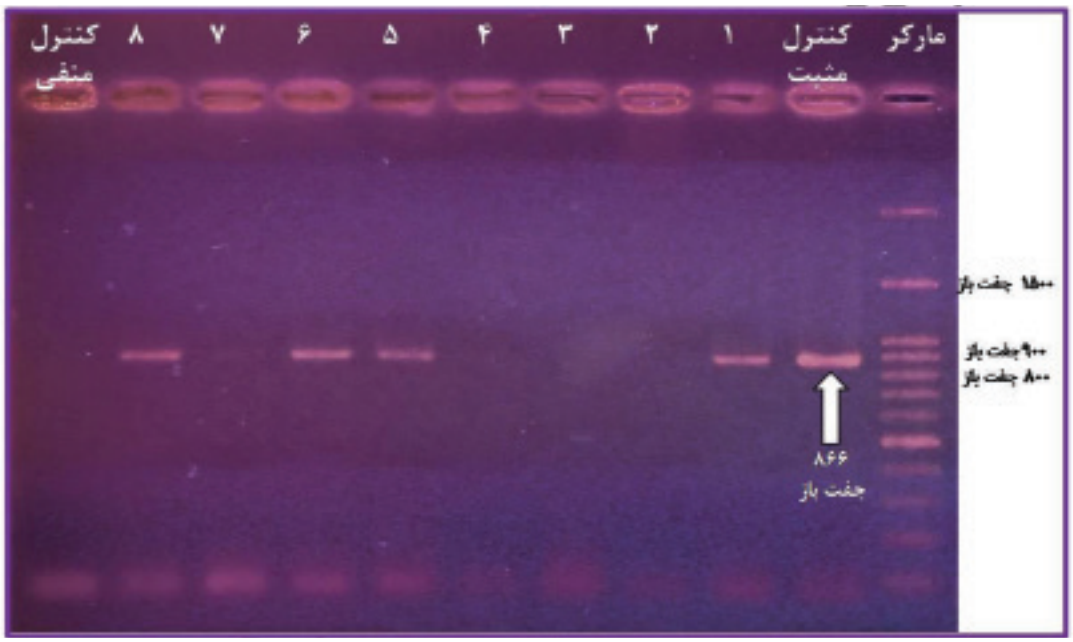


داده شدند (شکل ۱). در واکنش زنجیره پلیمراز اختصاصي آناپلاسما مارجیناله ۹۴ نمونه (۴۵/۲٪) از ۲۰۸ نمونه مورد آزمایش باند موردنظر را تشکیل دادند (شکل ۲). در مقایسه فراوانی آناپلاسما مارجیناله در گاوها در نوع دامداري از نظر مدیریت (سنتي، نیمه‌صنعتی) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیش‌ترین فراوانی مربوط به دامداري سنتي بود (P=۰,۰۲ =۵,۰۵ χ۲). در مقایسه فراوانی آناپلاسما مارجیناله در گاو بین سنین مختلف (بیش از ۳ سال، کمتر از ۳ سال) اخلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیش‌ترین فراوانی مربوط به سن بیش از ۳ سال بود (P=۰,۰۲ =۵,۰۹ χ۲). در مقایسه فراوانی آناپلاسما مارجیناله در گاو بین تولید شیر (بالا، معمولي و پایین) اخلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیش‌ترین فراوانی مربوط به گاوهایي بود که تولید بالا داشتند (P=۰,۰۵ =۵,۹۶ χ۲). در مقایسه فراوانی آناپلاسما مارجیناله در گاو از نظر اقلیم، ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایي، عرض جغرافیایي، فصل، سطح بهداشتي دامداري، ناقلین، تراکم گله و جنس دام اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰,۰۵) (جدول ۱). در آنالیز رگرسیون لجستیک چند متغیره نسبت شانس ابتلا به آناپلاسما مارجیناله در گاو در عرض جغرافیایي ۳۵-۳۴ درجه نسبت به عرض جغرافیایي <۳۵-۳۶، ۸/۹ به دست آمد. نسبت شانس ابتلا به آناپلاسما مارجیناله در گاوهای گاوداری‌های سنتي نسبت به گاوهای گاوداری‌های نیمه‌صنعتی ۸/۷ به دست آمد. نسبت شانس ابتلا به آناپلاسما مارجیناله در گاوهای گاوداری‌های که در آن‌ها کنه وجود داشت نسبت به گاوهای گاوداری‌هایی که در آن‌ها مگس‌های خون‌خوار وجود داشت ۱۱/۱ به دست آمد. نسبت شانس ابتلا به آناپلاسما مارجیناله در گاوهایي که سن بیش از ۳ سال داشتند نسبت به گاوهایي که سن کمتر از ۳ سال ۳/۶ به دست آمد. نسبت شانس ابتلا به آناپلاسما مارجیناله در گاوهایي که تولید بالا داشتند نسبت به گاوهایي که تولید معمولي داشتند ۶/۲ به دست آمد (جدول ۲). بر اساس جدول ۳ در مقایسه آزمون میکروسکوپي با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگي آزمون میکروسکوپي به ترتیب ۳۱/۹ و ۵۴/۴ درصد تعیین گردید. محاسبه ضریب کاپا بین آزمون ملکولي و میکروسکوپي آناپلاسما مارجیناله (۵۰ فیلد) نشان‌دهنده سطح ناچیز توافق دو آزمون بود (Kappa=۰,۱۳).

بحث

آناپلاسموزیس در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری (۴۰ درجه شمالي تا ۳۲ درجه جنوبي) در سراسر جهان رخ می‌دهد که ایران نیز از این قاعده مستثني نمی‌باشد. این بیماري از نظر اقتصادي یکي از مهم‌ترین بیماری‌ها در شش قاره جهان در نظر گرفته می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر ۳۹/۴٪ گسترش‌های خوني مورد بررسی با میکروسکوپ نوري از نظر حضور اجسام آناپلاسمایي شکل، مثبت تشخیص داده شدند. در بررسی گسترش‌های خونی گاوهای استان‌های مختلف ایران مقادیر کمتری در مقایسه با این تحقیق به ثبت رسیده است به طوری که

شکل ۲- تشخیص آناپلاسما مارجیناله **در استان سمنان به روش واکنش زنجیره پلیمراز. ۱، ۵، ۶ و ۸ نمونه‌هاي تکثیرشده با جفت آغازگر MSP۴۳/MSP۴۵ ژن *msp4*، محصول ۸۶۶ جفت باز.**



جدول ۱-میزان شیوع ملکولی آناپلاسما مارجیناله بر حسب برخی عوامل خطر در استان سمنان.

متغیر	گروه	تعداد گاو مورد آزمایش	موارد مثبت		فاصله اطمینان ۹۵ درصد	P value
			تعداد	درصد	حداقل-حداکثر	
کل	گاو	۲۰۸	۹۴	۴۵/۲	۵۲/۰-۳۸/۴	-
اقلیم	بیابانی	۷۶	۳۶	۴۷/۴	۵۸/۶-۳۶/۱	۰/۷۸
	کوهستانی	۵۸	۲۴	۴۱/۴	۵۴/۱-۲۸/۷	
	جلگه‌ای	۷۴	۳۴	۴۵/۹	۵۷/۳-۳۴/۶	
ارتفاع از سطح دریا (متر)	>۱۵۰۰	۵۰	۱۸	۳۶/۰	۴۹/۳-۲۲/۷	۰/۲
	۱۵۰۰-۱۰۰۰	۱۰۲	۵۲	۵۱/۰	۶۰/۷-۴۱/۳	
	۱۰۰۰-۵۰۰<	۵۶	۲۴	۴۲/۹	۵۵/۸-۲۹/۹	
طول جغرافیایی (درجه)	=۵۴>	۱۵۲	۷۰	۴۶/۱	۵۴/۰-۳۸/۱	۰/۷
	۵۱-۵۳	۵۶	۲۴	۴۲/۹	۵۵/۸-۲۹/۹	
عرض جغرافیایی (درجه)	۳۶>	۱۱۲	۴۴	۳۹/۳	۴۸/۳-۳۰/۲	۰/۰۶
	۳۴-۳۵	۹۶	۵۰	۵۲/۱	۶۲/۱-۴۲/۱	
فصل	فصل گرم	۹۲	۴۴	۴۷/۸	۵۸/۰-۳۷/۶	۰/۵
	فصل سرد	۱۱۶	۵۰	۴۳/۱	۵۲/۱-۳۴/۱	
نوع دامداري از نظر مدیریت	سنتي	۸۰	۴۴	۵۵/۰	۶۵/۹-۴۴/۱	۰/۰۲
	نیمه‌صنعتی	۱۲۸	۵۰	۳۹/۱	۴۷/۵-۳۰/۶	
سطح بهداشت دامداري	پایین	۱۱۰	۵۲	۴۷/۳	۶۵/۶-۳۷/۹	۰/۵۲
	بالا	۹۸	۴۲	۴۲/۹	۵۲/۷-۳۳/۱	
ناقلین موجود در دامداري	مگس‌های خون‌خوار	۱۰	۲	۲۰/۰	۴۴/۸-۴/۸	۰/۱
	کنه	۱۹۸	۹۲	۴۶/۵	۵۳/۴-۳۹/۵	
تراکم گله	پایین	۷۸	۳۴	۴۳/۶	۵۴/۶-۳۲/۶	۰/۷۲
	بالا	۱۳۰	۶۰	۴۶/۲	۵۴/۷-۳۷/۶	
سن	۳≥ سال	۱۰۶	۵۶	۵۲/۸	۶۲/۳-۴۳/۳	۰/۰۲
	۳ سال>	۱۰۲	۳۸	۳۷/۳	۶۴/۶-۲۷/۹	
جنس	ماده	۱۸۲	۸۴	۴۶/۲	۵۳/۴-۳۸/۹	۰/۴۶
	نر	۲۶	۱۰	۳۸/۵	۵۷/۲-۱۹/۸	
تولید شیر	بالا	۴۲	۲۶	۶۱/۹	۷۶/۶-۴۷/۲	۰/۰۵
	معمولي	۹۴	۳۸	۴۰/۴	۵۰/۳-۳۰/۵	
	بدون شیر و پایین	۷۲	۳۰	۴۱/۷	۵۳/۱-۳۰/۳	

در اطراف مشهد ۱۹/۳۷٪، در شهرستان فلاورجان اصفهان ۱۶/۷٪ و در کرمان ۳٪ گسترش‌های خونی آلوده به آناپلاسما بوده‌اند (۲۸, ۳۹, ۴۲). به‌طورکلی در یک مقاله مروری و متاآنالیز که حاصل مقالات منتشرشده در خصوص آناپلاسما از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۷ بود در مجموع درصد شیوع آناپلاسما در گاوهای ایران ۲۴٪ گزارش‌شده است (۴۷) که بسیار کمتر از یافته‌های تحقیق حاضر است. اگرچه در اکثر مقالات جمع‌آوری‌شده در این مقاله مروری نیز از روش میکروسکوپی برای تشخیص آناپلاسما در گسترش‌های خونی استفاده‌شده بود ولی به تعداد فیلدهای میکروسکوپی موردمطالعه اشاره نشده است. با توجه به اینکه تشخیص به روش میکروسکوپی استاندارد نیست و به تبحر آزمایشگر

جدول ۲- فراوانی و عوامل خطر مرتبط با شیوع مولکولي آناپلاسما مارجیناله در استان سمنان با استفاده از رگرسیون لجستیک چند متغیره.

متغیر	گروه	تعداد گاو مورد آزمایش	موارد مثبت		نسبت شانس تعدیل‌شده		P value
			تعداد	درصد	مقدار	فاصله اطمینان ۹۵ درصد حداقل-حداکثر	
عرض جغرافیایي(درجه)	۳۶-۳۵<*	۱۱۲	۴۴	۳۹/۳	۱	-	-
	۳۴-۳۵	۹۶	۵۰	۵۲/۱	۸/۹	۲/۸-۲۸/۴	<۰/۰۰۰۱
نوع دامداري از نظر مدیریت	نیمه‌صنعتی*	۱۲۸	۵۰	۳۹/۱	۱	-	-
	سنتي	۸۰	۴۴	۵۵/۰	۸/۷	۲/۶-۲۸/۷	<۰/۰۰۰۱
ناقلین موجود در دامداري	مگس‌های خون‌خوار*	۱۰	۲	۲۰/۰	۱	-	-
	کنه	۱۹۸	۹۲	۴۶/۵	۱۱/۱	۱/۹-۶۱/۹	۰/۰۰۶
سن	۳ سال*>	۱۰۲	۳۸	۳۷/۳	۱	-	-
	۳ سال≥	۱۰۶	۵۶	۵۲/۸	۳/۶	۱/۷-۷/۸	۰/۰۰۱
تولید شیر	معمولي*	۹۴	۳۸	۴۰/۴	۱	-	-
	بالا	۴۲	۲۶	۶۱/۹	۶/۲	۲/۰-۱۹/۴	۰/۰۰۲
	بدون شیر و پایین	۷۲	۳۰	۴۱/۷	۲/۱	۱/۰-۴/۸	۰/۰۸

*گروه مرجع: گروهی که به علت دارا بودن بیش‌ترین تعداد نمونه در متغیر مربوطه، به عنوان پایه در نظر گرفته‌شده و دیگر گروه‌ها با آن مقایسه شده ان.

جدول ۳- مقایسه آزمون میکروسکوپي و ملکولي در تشخیص آناپلاسما مارجیناله در استان سمنان.

میکروسکوپي (۵۰ فیلد) / ملکولي	منفي	مثبت	جمع
منفي	۶۲	۵۲	۱۱۴
مثبت	۶۴	۳۰	۹۴
جمع	۱۲۶	۸۲	۲۰۸

حساسیت آزمون میکروسکوپي = مثبت واقعي/(مثبت واقعي+منفي کاذب)*۱۰۰

ویژگي آزمون میکروسکوپي = منفي واقعي/(منفي واقعي+ مثبت کاذب)*۱۰۰

و تعداد فیلدهای مشاهده شد در یک گسترش بستگی دارد لذا با تغییر این عوامل میزان حساسیت این آزمون تغییر خواهد کرد (۳۲) در مطالعه حاضر افزایش تعداد فیلدهای میکروسکوپی گسترش‌های خونی موردمطالعه در بالا بردن حساسیت آزمون میکروسکوپی (تشخیص بیشتر انگل در گسترش‌های خونی) بسیار مؤثر بوده است. تحقیقات انجام‌شده در کشورهای همسایه شیوع متفاوت آناپلاسما مارجیناله را گزارش نموده‌اند. در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه بر روی ۱۸۴ نمونه خون گاو به روش میکروسکوپی انجام گرفت ۳/۸٪ گاوها به آناپلاسما مارجیناله آلوده بودند (۲). در مطالعه‌ای که در کشور پاکستان بر روی ۳۹۶ نمونه خون گاو به روش میکروسکوپی انجام گرفت ۱۰/۸۴٪ گاوها به آناپلاسما مارجیناله آلوده بودند (۴۶). در کشور عراق در بررسی میکروسکوپی ۴۰۰ نمونه خون گاو، شیوع آناپلاسما ۶۳/۵٪ گزارش شد (۸). به‌طورکلی تفاوت میزان شیوع بیماری در مناطق مختلف يك كشور يا در كشورهاي مختلف وابسته به شرايط اقليمي و آب و هوايي هر يك از مناطق می‌باشد و با تکثیر ناقلین بند پا در هر منطقه ارتباط مستقیمی دارد (۳۶). در این تحقیق حساسیت و ویژگي آزمون میکروسکوپي (مشاهده ۵۰ فیلد میکروسکوپی) در مقایسه با آزمون ملکولی در تشخیص آناپلاسما مارجیناله به ترتیب ۳۱/۹ و ۵۴/۴ درصد محاسبه گردید. در تحقیقی دیگر حساسیت و ویژگي آزمون میکروسکوپي (مشاهده ۵۰ فیلد میکروسکوپی) در مقایسه با آزمون ملکولی در تشخیص آناپلاسما مارجیناله ۲۵/۸٪ و ۹۱/۴٪ محاسبه‌شده بود (۳۲) که نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر همخواني دارد و نشان‌دهنده حساسیت پایین آزمون میکروسکوپي نسبت به آزمون ملکولي می‌باشد. در تحقیق انجام‌شده در فیلیپین نیز مشخص شد که موارد مثبت و منفي کاذب در آزمون میکروسکوپي (با مشاهده ۲۰ فیلد میکروسکوپي در هر گسترش خوني) نسبت به آزمون زنجیره پلیمراز آشیانه‌ای بیشتر است (۴). در واکنش زنجیره پلیمراز اختصاصي آناپلاسما مارجیناله، ۴۵/۲٪ از نمونه‌ها مثبت ارزیابي شدند. بر اساس بررسی منابع انجام‌شده این تحقیق اولین مطالعه ملکولی در خصوص شناسایی آناپلاسما مارجیناله در استان سمنان می‌باشد. در دیگر تحقیقات انجام‌شده در ایران شیوع آناپلاسما مارجیناله در گاوهاي استان‌های آذربایجان غربي با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز و ژن *msp4* ۰٪، در اصفهان با استفاده از روش PCR-RFLP و ژن *16S rRNA* ۳۸/۷٪ و در خوزستان با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز و ژن *msp4* ۴۴٪ تعیین شده است (۲۹, ۳۰, ۳۳) که شیوع آناپلاسما مارجیناله در استان سمنان با شیوع در استان‌های اصفهان و خوزستان همخواني دارد. در کشورهاي آسیایي نیز میزان شیوع آناپلاسما مارجیناله با روش‌های ملکولي ۳۱٪ در ترکیه، ۲۰٪ در عراق، ۱۵/۱۷٪ در پاکستان، ۶۷/۳٪ در فیلیپین و ۷۲/۶٪ در مالزي گزارش شده است (۲, ۴, ۸, ۳۶, ۴۶). علاوه بر تفاوت‌های اکولوژیکی و ناقلین در مناطق مختلف که در میزان شیوع آناپلاسما مارجیناله مؤثر مي باشند، انتخاب آغازگر از ژن‌های مناسب، روش جمع‌آوری نمونه، روش ذخیره خون و روش استخراج DNA از دلایل تفاوت نتایج در آزمون‌های ملکولي می‌باشد (۴). دراین‌مطالعه‌عرض‌جغرافیایي(۳۵-۳۴درجه)،نوع‌دامداري‌ازنظرمدیریت (سنتي)، ناقلین موجود در دامداري (کنه)، سن (بیش از ۳ سال) و تولید شیر (بالا) به عنوان عوامل خطر ابتلای گاوها به آناپلاسما مارجیناله بودند.

عرض جغرافیايي ۳۵-۳۴ درجه در استان سمنان مناطق کوهپایه‌ای را شامل می‌شود که شرایط براي پرورش دام و تکثیر ناقلین کنه‌ای مهیا است و به همین خاطر این منطقه نسبت به مناطق کوهستاني (۳۵-۳۶ درجه) به عنوان عامل خطر در نظر گرفته می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر در استان خوزستان نیز عرض جغرافیايي به عنوان عامل خطر آلودگي گاوها با گونه‌های آناپلاسما تعیین شد (۳۰). شرما و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که نواحي کوهپایه‌ای از عوامل خطر شیوع آناپلاسموزیس می‌باشند (۴۵) که نتایج دو تحقیق اخیر با نتایج تحقیق حاضر همخواني دارد. در این مطالعه شانس ابتلای گاوهای دامداری‌های سنتی به آناپلاسما مارجیناله نسبت به نیمه‌صنعتی ۸/۷ برابر بود. در دیگر مطالعه انجام‌شده در ایران خطر ابتلا به عفونت آناپلاسما فاگوسیتوفیلم در گاوهای مزارع سنتی در مقایسه با گاوهای مزرعه نیمه‌صنعتی ۱/۴ بیشتر بود (۲۷). اصولاً عفونت آناپلاسمایی در گاوداری های کوچک سنتی در مقایسه با گاوداری های بزرگ بیشتر است (۱) دامداران سنتی از دانش کمی در مورد بیماری منتقله از طریق کنه و اقدامات کنترل کنه در مقایسه با دامداران نیمه‌صنعتی برخوردار هستند (۴۱) و این دلیلی برای بالا بودن عفونت‌های آناپلاسمایی در گاوهای سنتی می‌تواند باشد. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، هیچ ارتباط معنی‌داری بین نوع گاوداری و بروز عفونت آناپلاسمایی در جنوب غربی ایران ثبت نشده است (۳۰). حضور کنه در دامداری از عوامل خطر ابتلا به عفونت آناپلاسما مارجیناله بود. با توجه به انتقال بیولوژیک آناپلاسما مارجیناله توسط ۲۰ گونه کنه این نتیجه دور از ذهن نمی‌باشد بطوری‌که آموریم و همکاران در سال ۲۰۱۴ در برزیل (۳)، رحمان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بنگلادش (۳۸)، داسیلوا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در برزیل (۱۲) و داسیلوا و فون سکا در سال ۲۰۱۴ در برزیل (۱۳) نیز حضور کنه در دامداری را از عوامل خطر مهم در ابتلا به عفونت آناپلاسما مارجیناله دانسته‌اند. سن بالای ۳ سال از دیگر عوامل خطر ابتلا به عفونت آناپلاسما مارجیناله بود. با افزایش سن، دام بیشتر در معرض عوامل بیماری‌زا از جمله آناپلاسما مارجیناله قرار خواهد گرفت بنابراین نسبت شانس آلودگی در سنین بالاتر بیشتر خواهد بود. محققان دیگر نیز در کشور برزیل نشان دادند که سن دام در فراوانی آلودگی نمونه‌ها به آناپلاسما مارجیناله تأثیر دارد (۳). رحمان و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بنگلادش سن بالاي ۲/۵ سال را از فاکتورهاي خطر ایجاد آلودگي با آناپلاسما مارجیناله دانستند (۳۸). اتیف و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پاکستان نشان دادند گاوهاي بیش از ۴ سال به عنوان ناقل در شیوع آناپلاسما مارجیناله دخیل‌اند (۵). در مطالعه‌ای در استان خوزستان نیز سن به عنوان یکی از عوامل خطر آلودگي گاوها با گونه‌های آناپلاسما تعیین شد (۳۰)؛ که کلیه تحقیقات اشاره‌شده با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. تولید شیر (بالا) به عنوان عامل خطر ابتلای گاوها به آناپلاسما مارجیناله بود. داسیلوا و فون سکا در سال ۲۰۱۴ در برزیل نشان دادند تعداد شکم زایش، زایمان و تولید شیر در میزان شیوع آناپلاسما مارجیناله نقش دارند که دلیل آن را تغییرات هورمونی پیرامون زایمان و سرکوب ایمنی ناشی از استرس‌های شیردهی دانسته‌اند (۱۳). در مطالعه‌ای در جنوب غربی ایران نیز تولید شیر پایین با خطر پایین آلودگي گاوها با گونه‌های آناپلاسما در ارتباط بود (۳۰)

که کلیه تحقیقات اشاره شده با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری کلي

نتیجه کلی این تحقیق نشان می‌دهد که عفونت آناپلاسما مارجیناله در گاوهای استان سمنان اندمیک است. اگرچه در این تحقیق تظاهرات بالینی ناشی از آناپلاسما مارجیناله در گاوهای استان سمنان نشده است ولی میزان شیوع آناپلاسما مارجیناله نسبت به یافته‌های دیگر استان‌ها و برخی از کشورهای اطراف ایران بالا است و نوع دامداري از نظر مدیریت (سنتي) به عنوان عامل خطر ابتلای گاوها به آناپلاسما مارجیناله بود که در این مورد برای کاهش شیوع عفونت لازم است اقدامات بهداشتی و کنترلی موردتوجه بیشتري قرار گیرند. افزایش آگاهی در گاوداران سنتی (در مورد چرخه زندگی کنه‌ها، نحوه مبارزه با کنه و بیماری‌های منتقله از طریق کنه) از طریق کلاس‌های ترویجی یک روش مؤثر و ساده برای کنترل عوامل منتقله از کنه در کوتاه مدت می‌باشد. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان داد که آزمون ملکولی نه‌تنها قابلیت تفریق گونه‌های آناپلاسما را دارد بلکه حساسیت آزمون ملکولی تقریباً سه برابر آزمون میکروسکوپی می‌باشد. اطلاعات حاصل از این مطالعه می‌تواند در سیاست های سازمان دامپزشکی در جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های منتقله از کنه در گاوهای استان سمنان مفید باشد، تحقیقات تکمیلی در خصوص شناسایی گونه‌های کنه ناقل آناپلاسما مارجیناله در این استان ضروری می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1- Abdela, N., N. Ibrahim and F. Begna. 2018. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern Ethiopia. *Acta Tropica* 177: 9-18.

2- Aktas, M. and S. Özübek. 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.

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

4- Aquino, A. J. B., B. P. Divina, A. M. Bombio and F. M. I. R. Pilapil. 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: 68-75.

5- Atif, F., M. Khan, F. Muhammad and B. Ahmad. 2013. Sero-epidemiological study of *Anaplasma marginale* among cattle. *J Anim Plant Sci* 23: 740-744.

6- Atif, F. A. 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res* 114: 3941-3957.

7- Aubry, P. and D. W. Geale. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases* 58: 1-30.

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

9- Carelli, G., N. Decaro, A. Lorusso, G. Elia, E. Lorusso, V. Mari, L. Ceci and C. Buonavoglia. 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 124: 107-114.

10- Coetzee, J. F., P. L. Schmidt, M. D. Apley, J. B. Reinbold and K. M. Kocan. 2007. Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *American journal of veterinary research* 68: 872-878.

11- da Silva, A. S., L. S. Lopes, J. D. Diaz, A. A. Tonin, L. M. Stefani and D. N. Araujo. 2013. Lice outbreak in buffaloes: evidence of *Anaplasma marginale* transmission by sucking lice Haematopinus tuberculatus. *Journal of Parasitology* 99: 546-547.

12- da Silva, J., Barbosa , G. Nunes de Santana Castro and A. H. Fonseca. 2014. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. Semina: Ciências Agrárias 35.

13- da Silva, J. B. and A. H. da Fonseca. 2014. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Tropical Animal Health and Production.*46: 461-465.

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

15- Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa. 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.

16- Eriks, I., G. Palmer, T. McGuire, D. Allred and A. Barbet. 1989. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle

by using a nucleic acid probe. J Clin Microbiol 27: 279-284.
17- Ewing, S. A. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University. Mississippi State, Miss. p. 395-423.
18- Foil, L. D. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today* 5: 88-96.
19- Grau, H. E., N. A. Cunha Filho, F. G. Pappen and N. A. Farias. 2013. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 22: 189-193.
20- Kocan, K. M., J. de la Fuente, A. A. Guglielmone and R. D. Meléndez. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Mcrobiology Reviews* 16: 698-712.
21- Kocan, K. M., J. d. l. Fuente, D. L. Step, E. F. Blouin, J. F. Coetzee, K. M. Simpson, S. G. Genova and M. J. Boileau. 2010. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. *Bovine Practitioner* 44: 93-102.
22- Liu, Z., J. Luo, Q. Bai, M. Ma, G. Guan and H. Yin. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Veterinary microbiology* 107: 145-148.
23- Noaman, V. 2013. Discrimination between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* by PCR-RFLP. *World Applied Science Journal* 21: 190-195.
24- Noaman, V. 2013. Report of *Anaplasma centrale* (Amori strain) in cattle in Iran. *Veterinary Journal (Pajouhesh Va Sazandegi)* 26: 26-29 (In Persian).
25- 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: 2-15 (In Persian).
26- Noaman, V. 2019. A review on *Anaplasma phagocytophilum* as a zoonotic agent. *Tehran University Medical Journal* 76: 778-785 (In Persian).
27- 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.
28- Noaman, V., S. Arabzadeh and B. Kachouei. 2001. A study on anaplasmosis in cattle of falavarjan city, isfahan province (1995-2000). *Pajouhesh Va Sazandegi* 51: 10-12 (In Persian).
29- Noaman, V. and D. Bastani. 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.
30- Noaman, V. and M. Moradi. 2019. Molecular Epidemiology and Risk Factors Assessment of *Anaplasma* spp. on Dairy Cattle in Southwest of Iran. *Acta Veterinaria Eurasia* 45: 30-36.
31- Noaman, V., A. Nabinejad, A. Shahmoradi and S. Esmaeilkhanian. 2016. Molecular Detection of Bovine Leukocytic *Anaplasma* Species in Isfahan, Iran. *Research in Molecular Medicine* 4: 47-51.
32- Noaman, V. and P. Shayan. 2010. Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iranian Journal of Microbiology* 2: 1-2.
33- Noaman, V., P. Shayan and N. Amininia. 2009. Molecular Diagnostic of *Anaplasma marginale* in Carrier Cattle. *Iran J Parasitol* 4: 1-2.
34- Noaman, V., P. Shayan and A. Shahmoradi. 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: 27-37.
35- OIE. Section. 2012. Bovine anaplasmosis, Section 2.4. Bovinae. 589-600. World Organization for Animal Health OIE terrestrial manual Paris, France.
36- Ola-Fadunsin, S. D., F. I. Gimba, D. A. Abdullah, R. S. K. Sharma, F. J. F. Abdullah and R. A. Sani. 2018. Epidemiology and risk factors associated with *Anaplasma marginale* infection of cattle in Peninsular Malaysia. *Parasitology international* 67: 659-665.
37- Potgieter, F. T., B. Sutherland and H. C. Biggs. 1981. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with Hippobosca rufipes and Stomoxys calcitrans. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 48: 119-122.
38- Rahman, A., S. Sumon, M. Khan and M. Islam. 2015. Current status of subclinical form of babesiosis and anaplasmosis in cattle at Rangpur district in Bangladesh. Progressive Agriculture 26: 51-59.
39- Razmi, G. R., K. Dastjerdi, H. Hossieni, A. Naghibi, F. Barati and M. Aslani. 2006. An epidemiological study on *Anaplasma* infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburb, Khorasan Province, Iran. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078: 479-481.
40- Ristic, M. Section. 1977. Bovine anaplasmosis. 245. In: Kreier JP, editor. Parasitic Protozoa. Academic Press. New York.
41- Sajid, M. S., Z. Iqbal, M. N. Khan, G. Muhammad and M. K. Khan. 2009. Prevalence and associated risk factors for bovine tick infestation in two districts of lower Punjab, Pakistan.*Preventive Veterinary Medicine*.92: 386-391.
42- SalehZadeh, S., S. Fathi, M. M. Dehaghi, E. N. Asl and H. A. Nezhad. 2011. Survey of *Theileria annulata* and *Anaplasma marginale* in cattle in Kerman area, Southeast of Iran. *Scientia Parasitologicaol* 12: 61-66.
43- Scoles, G. A., A. B. Broce, T. J. Lysyk and G. H. Palmer. 2005.

Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 42: 668-675.

44- Scoles, G. A., J. A. Miller and L. D. Foil. 2008. Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni Stiles* (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 45: 109-114.

45- Sharma, A., L. Singla, P. Kaur and M. Bal. 2015. PCR and ELISA vis-à-vis microscopy for detection of bovine anaplasmosis: a study on associated risk of an upcoming problem in North India. *The Scientific World Journal* 2015.

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

47- Soosaraei, M., M. M. Haghi, F. Etemadifar, M. Fakhar, S. H. Teshnizi, S. Asfaram and B. R. Esboei. 2020. Status of *Anaplasma* spp. infection in domestic ruminants from Iran: A systematic review with meta-analysis. *Parasite Epidemiol Control* 11: e00173.