مقاله کامل

دوره هفدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۰

DOI: 10.22055/IVJ.2019.197984.2177
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.12.5

شیوع مولکولی گونه‌های *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران

نصرالله واحدی‌نوری[1*] و وحید نعمان[2]

[1] استادیار مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[2] دانشیار مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

دریافت:۱۳۹۸/۵/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۴

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران بود. برای این منظور تعداد ۱۰۵ نمونه خون از طریق رگ وداج گاو به طور تصادفی از نقاط مختلف استان مازندران جمع‌آوری گردید. در ابتدا DNA استخراجی از نمونه‌های خونی با جفت آغازگری که قطعه‌ی ۱۴۶۸ جفت بازی از ژن 16S rRNA جنس *آناپلاسما* را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. ۲۹ نمونه (۲۷/۶ درصد) از ۱۰۵ نمونه گاوی در اولین PCR و nested-PCR از نظر جنس *آناپلاسما* مثبت شدند. تمامی نمونه‌های مثبت با nested-PCR اختصاصی از نظر وجود *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*) بررسی شدند و ۲۱ نمونه (۲۰ درصد) از نظر *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، ۱۲ نمونه (۱۱/۴ درصد) از نظر *آناپلاسما بوویس* و ۱ نمونه (۱ درصد) از نظر *آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*) مثبت تشخیص داده شد. DNA استخراجی نمونه‌های مثبت با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که قطعه ۸۶۶ جفت بازی از ژن *msp4* *آناپلاسما مارژیناله* را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد که ۵ نمونه (۴/۸ درصد) از ۱۰۵ نمونه گاوی از نظر *آناپلاسما مارجیناله* مثبت بودند. این مطالعه اولین تشخیص ملکولی گونه‌های *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران بوده است. نتایج نشان می‌دهد که در بین درصد آلودگی گاو به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، در فصول مختلف سال و نوع دامداری، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین از نظر درصد آلودگی به *آناپلاسما بوویس*، از میان متغیرهای مورد بررسی، بین فصول مختلف سال و نوع دامداری اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

کلمات کلیدی: شیوع مولکولی، گونه‌های *آناپلاسما*، گاو، مازندران

مقدمه

از میان بیماری‌های منتقله به وسیله‌ی کنه‌ها، *آناپلاسموز* گاوی به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های در سراسر دنیا به حساب آمده که سبب زیان‌های اقتصادی قابل توجه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا می‌گردد (Kocan et al. 2008). اهمیت اقتصادی- اجتماعی *آناپلاسموز*، سبب گردیده تا سازمان جهانی بهداشت دام، آن را در زمره‌ی بیماری‌های قابل اخطار، اعلام نماید. گاو توسط چهار گونه: *آناپلاسما مارژیناله*، *آناپلاسما سنتراله*، *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* و *آناپلاسما بوویس* آلوده می‌گردد. بیماری با کم‌خونی پیشرفته و حضور اجرام انگلی در گلبول‌های قرمز یا سفید همراه است. کاهش تولید شیر و کاهش وزن دام بیمار مشاهده می‌شود (Stuen et al. 2003). حیوانات مبتلا به *آناپلاسموز* حاد دارای علائم تب و بی‌اشتهایی بوده، اما مرگ به ندرت اتفاق می‌افتد، مگر این که با عفونت‌های

*نویسنده مسئول : نصرالله واحدی‌نوری، استادیار مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
E-mail: nsvahedi@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

ثانویه همراه باشد (Engvall & Egenvall, 2002). گونه‌های *آناپلاسما مارژیناله* و *آناپلاسما سنتراله*، به لحاظ آنتی‌ژنی به هم نزدیک می‌باشند. با این حال از لحاظ بیماریزایی در گاو متفاوت عمل می‌کنند. *آناپلاسما مارژیناله* در گاوها به خصوص بالای دو سال بسیار بیماری‌زا بوده، در حالی که *آناپلاسما سنتراله* معمولاً سبب عفونت ملایم می‌گردد (Carelli et al. 2008). *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* عامل بیماری تب مرتع یا تب منتقله از کنه‌ها می‌باشد (Stuen, 2007). گاوهای مبتلا به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* معمولاً پس از بهبود از وضیعت حاد، به صورت مزمن، حامل عفونت باقی مانده و بیماری در صورت بروز استرس و یا هر گونه عوامل تأثیرگذار بر سیستم ایمنی بدن، مجدداً عود می‌نماید. در حیوانات و همچنین انسان *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* عامل *آناپلاسموز گرانولوسیتیک* است که به عنوان یک بیماری نوپدید در بهداشت و سلامت جامعه به ثبت رسیده است (Dumler et al. 2007). *آناپلاسما بوویس* هم در حیوانات اهلی و هم در حیوانات وحشی سراسر دنیا گزارش شده است (Liu et al. 2012). معمولاً بررسی گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا از دام‌هایی که در فاز حاد بیماری به سر می‌برند و همچنین محل استقرار انگل در گلبول قرمز و سفید، ملاک تشخیص و تعیین گونه‌های *آناپلاسما* می‌باشد؛ اما نه تنها این روش، بلکه حتی روش‌هایی نظیر کشت باکتری در سلول‌های کنه و سرولوژیکی شامل الایزا و غیره . . . برای تشخیص و شناسایی دام‌های بدون نشانه‌های بالینی و یا حامل، امکان‌پذیر نیست. به خصوص زمانی که میزان ارگانیزم در سطح خون پائین باشد؛ زیرا الایزا و تعیین حضور آنتی‌بادی علیه باکتری، علاوه بر واکنش متقاطع، الزاماً دلیل بر آلودگی دام در زمان آزمایش نیست (Aubry & Geale, 2011). همچنین اگر چه کشت، یک روش طلایی برای تشخیص باکتری‌ها محسوب می‌گردد، ولی برای این جنس از باکتری‌ها اصولاً، امکان‌پذیر نیست. به علاوه روش تزریق به حیوانات آزمایشگاهی هم روشی آسان نیست. با این توصیف، روش مولکولی برای تشخیص *آناپلاسما* در گاو توصیه می‌شود. امروزه با استفاده از روش‌های مولکولی و بر اساس تعیین توالی ژن 16S rRNA، اعضای باکتری خانواده‌ی *آناپلاسماتاسه آ* را می‌توان طبقه‌بندی نمود (Dumler et al. 2001). صرف نظر از گونه *آناپلاسما*، خسارات ناشی از *آناپلاسموز* در نشخوارکنندگان و به خصوص گاو در دنیا قابل توجه می‌باشد(Kocan et al. 2003). در ایران خسارات ناشی از بیماری برآورد نشده است و سالانه هم زمان با فصول گرم سال و افزایش ناقلین بندپا، شاهد ظهور این بیماری هستیم که خسارات جبران‌ناپذیری را به دامداران تحمیل می‌کند. Pazhoomو همکاران در سال ۲۰۱۶ برای اولین بار در استان مازندران (منطقه‌ی سوادکوه) ، گونه‌ی *آناپلاسما بوویس* را از کنه‌های گونه‌ی *ریپی سفالوس سانگی نئوس*، *ریپی سفالوس بورسا*، *ریپی سفالوس تورانیکوس*، *درماسنتور مارژیناتوس*، *همافیزالیس پونکتاتا*، *همافیزالیس اینرمیس*، *همافیزالیس کونسینانا* و *ایکسودس ریسینوس* به روش مولکولی، جداسازی و شناسایی نمودند. تحقیقات آن‌ها اولین گزارش از حضور *آناپلاسما بوویس در کنه همافیزالیس اینرمیس می‌باشد*. با وجود پراکنش گونه‌های مختلف کنه‌های سخت در نشخوارکنندگان استان، آلودگی به گونه‌های مختلف *آناپلاسما* در این استان دور از انتظار نیست (Vahedi et al. 2016). با این حال تا کنون هیچ گونه گزارش مدونی از *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران ثبت نشده و این تحقیق برای اولین بار به صورت تفصیلی به شناسایی گونه‌های بیماری‌زای *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران به روش مولکولی می‌پردازد.

مواد و روش کار

این تحقیق روی گاوهای استان مازندران انجام گردید. برای این منظور در سال ۱۳۹۵ و در طی فصول مختلف، به صورت تصادفی از ۱۰۵ رأس گاو به ظاهر سالم از نقاط مختلف استان (ساری-قائم شهر-بابل و آمل)، نمونه‌گیری خون به عمل آمده است. از هر دام ۵ میلی‌لیتر خون از

ورید وداج اخذ و در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در یخزن (۲۰°C-) جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید. هم‌زمان متغیرهایی نظیر فصل، سن و نوع دامداری، در فرم مخصوص ثبت گردید. از آنجایی که سن به عنوان یکی از فاکتورهای خطر در بروز *آناپلاسموز* نقش دارد (Noaman & Moradi, 2019) سن دام بر اساس بررسی دندان‌ها تعیین گردید (Pace et al. 2003). همچنین دام‌های مورد بررسی نیز همگی دو رگ (آمیخته) بودند. بر اساس اظهارات دامداران در تمام دامداری‌ها کنه مشاهده شده بود و در ۸۴/۸ درصد از دام‌داری‌های مورد نمونه‌گیری سم‌پاشی منظم بر ضد انگل‌های خارجی انجام می‌شد.

جهت شناسایی مولکولی *آناپلاسما* در گاو مراحل ذیل انجام گردید:

الف) استخراج DNA : برای این منظور، نمونه‌های خون را از یخزن خارج و در دمای اتاق قرار داده، پس از ذوب، تقریباً ۵۰ میکرو لیتر از هر نمونه را در داخل تیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA تولید شده در شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت، استخراج DNA انجام گرفت. سپس DNA استخراجی بر اساس دستورالعمل، روی ژل آگارز مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

ب) PCR اولیه : PCR اولیه برای تشخیص جنس *آناپلاسما* بدون در نظر داشتن گونه خاصی انجام گرفت. بدین منظور از جفت آغازگر Anaplasma all استفاده شد که ترادف نوکلئوتیدی آن در تمامی گونه‌های *آناپلاسما*وجود دارد (Weisburg et al. 1991). آغازگرهای به کار رفته به صورت زیر بوده است.

Anaplasma all Sense: 5` AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3`
Anaplasma all Antisense: 5'ACAGCTACCTTGTTACGACTT 3'

باند حاصله از تکثیر در اثر این جفت آغازگر، پس از PCR ، در همه‌ی گونه‌ها در حدود ۱۴۶۸ جفت باز خواهد بود. محصول تکثیر شده توسط این جفت آغازگر در برگیرنده‌ی قطعه‌ی بسیار متغیر (Hyper Variable Region) V1 از ژن 16S rRNA جنس *آناپلاسما* است.

بعد از اتمام PCR، نمونه‌ها الکتروفورز گردیدند. جهت ارزیابی باندهای به دست آمده از نشان‌گر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ساخت شرکت Cinna Gen استفاده گردید.

پ) Nested PCR : جهت تأیید قطعه‌ی تکثیر شده در PCR اولیه که توسط آغازگرهای Anaplasma all تکثیر شد، دو آغازگر در داخل قطعه تکثیر شده طراحی گردید. این دو آغازگر جدید اگر چه گونه‌ی 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 قطعه‌ی تکثیری حاصل از آغازگرهای Anaplasma-nested- Sense و Anaplasma-nested-Antisense ، قسمت بسیار متغیر ژن 16S rRNA نیز تکثیر می‌شود؛ بنابراین از قطعه‌ی مذکور نیز می‌توان در جهت تشخیص گونه استفاده نمود. بعد از اتمام PCR و انجام الکتروفورز، در صورت مشاهده‌ی باندی با وزن ۳۴۵ جفت باز، نمونه مثبت تلقی و صحت PCR اولیه تأیید می‌شد.

ت) nested PCR جهت تشخیص گونه‌های *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، *آناپلاسما بوویس و آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*): با توجه به این که نوکلئوتیدهای قسمت بسیار متغیر V1 ژن 16S rRNA در سه گونه‌ی *آناپلاسمای* فوق دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای می‌باشند لذا آغازگرهای Sense اختصاصی برای گونه‌های *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، *آناپلاسما بوویس و آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*) طراحی شد (Table 1).

Table 1. List of specific primers designed based on 16S rRNA gene for the detection of *Anaplasma* spp.

Name of primer	Nucleotid sequences (5'-3')	Annealing temperature °C	Cycles	PCR-product
Anaplasma Phagocytophilum Sense	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC	58	35	926
Anaplasma Phagocytophilum Antisense	CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC			
Anaplasma bovis Sense	CTCGTAGCTTGCTATGAGAAC	55	35	551
Anaplasma bovis Antisense	TCTCCCGGACTCCAGTCTG			
Anaplasma central(Amori) Sense	CAAATCTGTAGCTTGCTACGGA	54	35	403
Anaplasma central(Amori) Antisense	GAGTTTGCCGGGACTTCTTCT			

بنابراین با استفاده از محصول PCR اولیه (۱۴۶۸ جفت باز) و با آغازگرهای Sense و Antisense اختصاصی آزمایش تعیین گونه nested PCR برای هر نمونه انجام شد.

در این آزمایش مواد با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر و بر اساس دستورالعمل تهیه گردید. بعد از آماده‌سازی محلول‌ها در تیوب اپندورف ۲۰۰ میکرولیتر، این تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) قرار گرفته و تحت برنامه‌ی مورد نظر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت (Table 2). نتیجه بعد از الکتروفورز و در صورتی که نمونه با هر جفت از آغازگرهای اختصاصی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، *آناپلاسما بوویس* و *آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*) تکثیر می‌شد، به ترتیب باندی در حدود ۹۲۶ جفت باز، ۵۵۱ جفت باز و یا ۴۰۳ جفت باز روی ژل مشاهده می‌گردید و گونه‌ی *آناپلاسما* در رابطه با آغازگری که واکنش داشت، تعیین می‌گردید. برای همه‌ی نمونه‌ها یک کنترل منفی (آب مقطر به جای نمونه) و یک کنترل مثبت (تهیه شده از بخش دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان) در نظر گرفته شد.

Table 2. PCR solutions and protocol for the detection of *Anaplasma* spp.

Solutions	Volume	Amplification program	Temperature °C	Time	Cycles
Template	0.5 µl	Heated Lid	110ºc		
Taq PCR buffer (10 x)	2 µl	Denaturation step	95 ºc	5'	
$MgCl_2$(50 mM)	0.6 µl	Start cycle			
dNTP (10 mM each)	0.4 µl	Denaturation step	94 ºc	30"	35
Primer-sense (20µM)	0.4 µl	Annealing step	54-58 ºc	30"	
Primer-antisense (20µM)	0.4 µl	Extension step	72 ºc	45"	
Taq DNA polymerase (5 U/ µl)	0.1 µl	End cycle			
Distilled water	15.6µl	Extention (End)	72 ºc	10'	
Total volume	20µl				

ث) PCR جهت تکثیر گونه‌های *آناپلاسما مارژیناله* با استفاده از ژن *msp4* : برای این منظور آغازگرهای اختصاصی طراحی شد که بتواند فقط ژن *msp4* گونه *آناپلاسما مارژیناله* را در خون گاو تکثیر نماید. محصول

مورد انتظار حاصل از تکثیر این دو آغازگر باندی در حدود ۸۶۶ جفت باز بود. آغازگرهای به کار رفته به صورت زیر بوده است.

Marginale-Sense: 5' GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTT TAC3'
Marginale-Antisense: 5'CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC 3'

در صورتی که نمونه با هر جفت از آغازگرهای اختصاصی *آناپلاسما مارژیناله* تکثیر می‌شد، باندی در حدود ۸۶۶ جفت باز روی ژل مشاهده می‌گردید و گونه‌ی *آناپلاسما مارژیناله* تعیین می‌شد.

در پایان پس از به دست آمدن نتایج، از نرم افزار SPSS 18 و آزمون کای دو با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵)، جهت مقایسه درصد فراوانی آلودگی در گونه‌های مختلف شناسایی‌شده *آناپلاسما* و همچنین مقایسه‌ی درصد آلودگی هر یک از آن‌ها در فصول مختلف سال، سنین مختلف و نوع دامداری استفاده شد.

نتایج

شناسایی گونه‌های *آناپلاسما* در گاو

بر اساس روش کار، به دنبال استخراج DNA و انجام PCR اولیه و سپس جهت تأیید تشخیص PCR اولیه با روش nested-PCR، نتایج تکثیر با جفت آغازگر مربوطه، محصولی به اندازه‌ی ۳۴۵ جفت باز ایجاد کرد که با اندازه‌ی محصول مورد انتظار کاملاً منطبق بود (Fig 1).

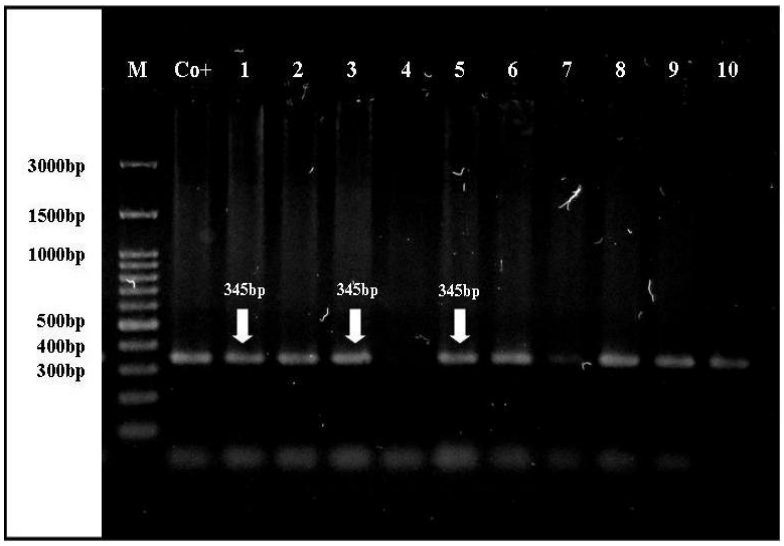

Figure 1. Nested-PCR for *Anaplasma* spp.. The expected size (345 bp) is indicated (lanes 1 to 10). Co+= positive controls, M= Marker 100 bp.

در مجموع ۲۹ نمونه (۲۷/۶ درصد) از ۱۰۵ رأس گاو نمونه‌گیری شده در PCR اولیه و نهایتاً nested-PCR از نظر آلودگی با جنس *آناپلاسما* مثبت بودند (Table 3).

جهت تعیین گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، محصول PCR اولیه با جفت آغازگر Anaplasma-phagocytophilum-sense و Anaplasma-phagocytophilum-Antisense تکثیر شد که در نتیجه‌ی آن، از ۱۰۵ نمونه اولیه، در ۲۱ نمونه (۲۰ درصد) باند مورد نظر مشاهده شد (Fig 2).

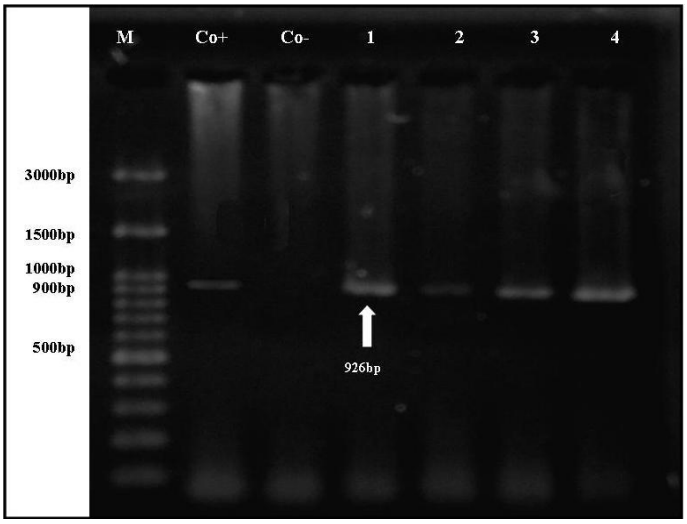

Figure 2. Specific nested-PCR for *Anaplasma phagocytophilum*. The expected size (926 bp) is indicated (lanes 1 to 4). Co+ and Co- are positive and negative controls, respectively. M= Marker 100 bp.

همچنین جهت تعیین گونه‌ی *آناپلاسما بوویس*، DNA کل نمونه‌ها، توسط جفت آغازگر اختصاصی Anaplasma bovis sense و Anaplasma bovis Antisense تکثیر شدند که در نتیجه‌ی آن ۱۲ نمونه (۱۱/۴ درصد) از نمونه‌های مثبت اولیه، محصول مورد نظر ۵۵۱ جفت بازی مشاهده شد (Fig 3).

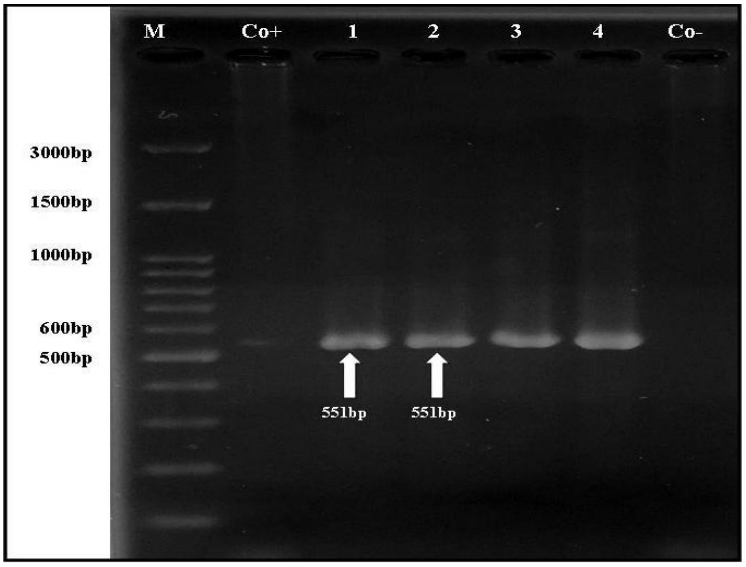

Figure 3. Specific nested-PCR for *Anaplasma bovis*. The expected size (551 bp) is indicated (lanes 1 to 4). Co+ and Co- are positive and negative controls, respectively. M= Marker 100 bp.

همچنین جهت تعیین گونه‌ی *آناپلاسما مارژیناله* DNA کل نمونه‌ها، توسط جفت آغازگر اختصاصی Anaplasma marginale sense و Anaplasma marginale Antisense بر گرفته از ژن *msp4* تکثیر شدند که در نتیجه‌ی آن در ۵ نمونه (۴/۸ درصد)، محصول مورد نظر ۸۶۶ جفت بازی مشاهده شد (Fig 4).

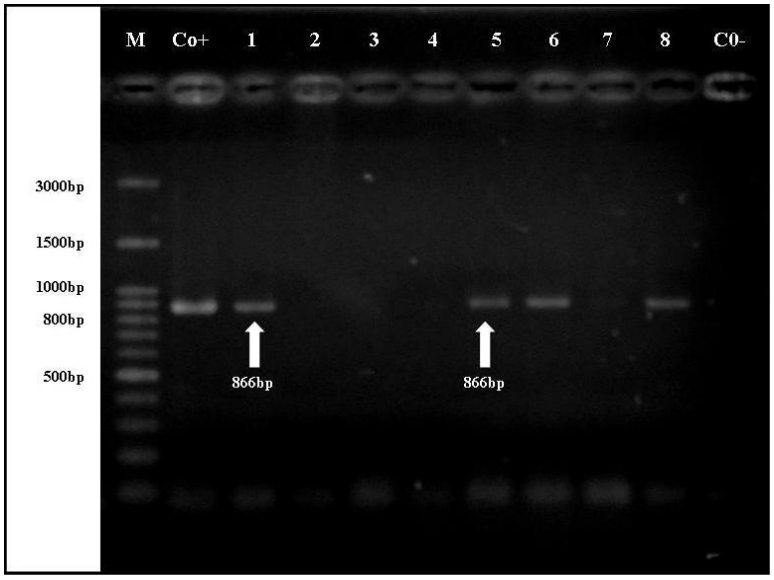

Figure 4. PCR for *Anaplasma marginale*. The expected size (866 bp) is indicated (lanes 1 to 8). Co+ and Co- are positive and negative controls, respectively. M= Marker 100 bp.

Table 3. The molecular results of *Anaplasma* spp. detecting in blood cattle samples.

Anaplasma species	Sampled cattle	Positive	prevalence %	95 % Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Anaplasma	105	29	27.6	20	36.9
Anaplasma phagocytophilum	105	21	20	13.5	28.7
Anaplasma bovis	105	12	11.4	6.7	18.9
Anaplasma marginale	105	5	4.8	2.1	10.7
Anaplasma centrale (Amori strain)	105	1	1	0.2	5.2

آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاو بر اساس متغیرهای مورد مطالعه

از ۱۰۵ رأس گاو مورد بررسی، ۲۱ رأس (۲۰ درصد) آلوده به باکتری *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* بودند (Table 3). بر این اساس، درصد آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در فصول مختلف سال، به ترتیب بهار (۰ درصد)، تابستان (۰ درصد)، پائیز (۳۱/۸ درصد) و زمستان (۰ درصد)، می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه‌ی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* گاو در استان مازندران و در فصول مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (Table 4).

همچنین درصد آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در بین گاو و در سنین مختلف به ترتیب کم‌تر از ۱ سال (۰ درصد)، ۱ الی ۳ سال (۲۰/۶ درصد)، ۳–۵ سال (۲۵/۵ درصد) و بالای ۵ سال (۱۸/۸درصد) می‌باشد (Table 4). در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاوهای استان مازندران در سنین مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (Table 4).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* و نوع دامداری (سنتی–نیمه‌صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۰ درصد) و نیمه‌صنعتی (۲۶/۹ درصد) به دست آمده است (Table 4). در مقایسه‌ی فراوانی گونه‌ی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاوهای استان مازندران در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (Table 4).

Table 4. Distribution of *Anaplasma phagocytophilum* according to Season, Age, and Farm type in Mazandaran province

Category		Number tested	Positive		Chi-square	df	P-Value*
			Numbe	Prevalence %			
Season	Spring	17	0	0	15.51	3	0.001
	Summer	16	0	0			
	Fall	66	21	31.8			
	Winter	6	0	0			
Age	<1Year	12	0	0	3.86	3	0.277
	1-3Years	34	7	20.6			
	3-5Years	43	11	25.5			
	>5Years	16	3	18.8			
Farm type	Traditional	27	0	0	9.087	1	0.003
	Semi-Industrial	78	21	26.9			

*P<0.05

آلودگی *آناپلاسما بوویس* در گاو بر اساس متغیرهای مورد مطالعه

از ۱۰۵ رأس گاو مورد بررسی، ۱۲ رأس (۱۱/۴ درصد) آلوده به باکتری *آناپلاسما بوویس* بودند (Table 3). بر اساس نتایج به دست آمده (Table 5)، درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار (۰ درصد)، تابستان (۰ درصد)، پاییز (۱۸/۲ درصد) و زمستان (۰ درصد) می‌باشد. در مقایسه فراوانی گونه‌ی *آناپلاسما بوویس* درگاه استان مازندران در فصول مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (Table 5).

همچنین درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در بین گاو و در سنین مختلف به ترتیب کم‌تر از ۱ سال (۰ درصد)، ۱–۳ سال (۲۰/۶ درصد)، ۳–۵ سال (۱۱/۶ درصد) و بالای ۵ سال (۰ درصد) می‌باشد (Table 5). در مقایسه فراوانی گونه *آناپلاسما بوویس* در گاوهای استان مازندران در سنین مختلف نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (Table 5).

در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گاو مورد مطالعه به *آناپلاسما بوویس* و نوع دامداری (سنتی –نیمه‌صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۰ درصد) و نیمه‌صنعتی (۱۵/۴ درصد) به دست آمده است (Table 5). در مقایسه فراوانی گونه‌ی *آناپلاسما بوویس* در گاوهای استان مازندران در ارتباط با نوع دامداری نمونه‌گیری شده، با انجام آزمون کای دو، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (Table 5).

Table 5: Distribution of *Anaplasma bovis* according to Season, Age, and Farm type in Mazandaran province

Category		Number tested	Positive		Chi-square	df	P-Value*
			Numbe	Prevalence %			
Season	Spring	17	0	0	8.006	3	0.046
	Summer	16	0	0			
	Fall	66	12	18.2			
	Winter	6	0	0			
Age	<1Year	12	0	0	6.433	3	0.092
	1-3Years	34	7	20.6			
	3-5Years	43	5	11.6			
	>5Years	16	0	0			
Farm type	Traditional	27	0	0	4.690	1	0.030
	Semi-Industrial	78	12	15.4			

*P<0.05

آلودگی *آناپلاسما مارجیناله* و *آناپلاسما سنترالِه* در گاوهای مورد مطالعه

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، میزان آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما مارجیناله* و *آناپلاسما سنترالِه*، به ترتیب ۴/۸ درصد و ۱ درصد می‌باشد (Table 3). با توجه به پایین بودن درصد آلودگی، از نقش و تأثیر متغیرهای مورد مطالعه بر روی میزان شیوع صرف نظر و تنها به ذکر این نکته اکتفا نموده که در مورد هر دو گونه مذکور، آلودگی دام‌ها در فصل پاییز و سن دام‌ها بالای ۲ سال بوده است.

بحث

از مجموع ۱۰۵ نمونه DNA استخراج شده از خون گاو، ۲۹ نمونه (۲۷/۶ درصد) در PCR اولیه و nested PCR، از نظر جنس *آناپلاسما* مثبت بودند (Fig 1, Table 3). با توجه به این که نمونه‌گیری از دام‌هایی صورت گرفته است که فاقد هرگونه علائم بالینی ناشی از *آناپلاسموز* بودند، لذا این میزان درصد آلودگی قابل توجه می‌باشد. نکته قابل ذکر این می‌باشد که روش مورد استفاده در این تحقیق در مقایسه با سایر روش‌ها نیز از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است (Tana et al. 2017).

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که ۲۱ نمونه (۲۰ درصد) از ۱۰۵ نمونه اولیه به لحاظ *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* مثبت بوده و باند مورد نظر (۹۲۶ جفت باز) را تشکیل دادند (Fig 2, Table 3). با پیشرفت روش‌های مولکولی، امروزه مشخص شده که باکتری مذکور در نیمکره‌ی شمالی از توزیع بالایی برخوردار می‌باشد (Rymaszewska, 2011). معمولاً آلودگی با *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم*، فاقد علایم کلینیکی می‌باشد، ولی به هر حال علایم خفیفی از لاغری، کاهش تولید شیر و سقط و ضعف سیستم ایمنی وجود خواهد داشت که هرگاه با آلودگی‌های دیگر باکتریایی همراه گردد، می‌تواند عوارض شدیدی به دنبال داشته باشد (Renneker et al. 2013). اگر چه تحقیقات Bashiribod و همکاران در سال ۲۰۰۴ روی کنه‌ی گونه‌ی *ایکسودس ریسینوس* جمع‌آوری شده از منطقه‌ی قائم‌شهر، وجود *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* را در استان مازندران تأیید نموده است، ولی تا کنون گزارش مستندی مبنی بر حضور *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در دام و انسان در مازندران مشاهده نشده و این تحقیق اولین گزارش تشخیص مولکولی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاوهای استان مازندران می‌باشد. در ایران نیز در بررسی انجام شده توسط Noaman و Shayan در سال ۲۰۰۹ روی گاوهای استان اصفهان بر اساس ژن ۱۶ S rRNA مشخص گردید که ۱/۳۳ درصد از نمونه‌ها در آزمایش nested PCR با آغازگر اختصاصی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* مثبت بودند. در تحقیقات آن‌ها نیز نشانه‌های بالینی در گاوهایی که مثبت بودند، ثبت نشد و در بررسی گسترش‌های خونی این دام‌ها هیچ گونه گنجیدگی در نوتروفیل ها مشاهده نگردید که نشانه‌ی حامل بودن دام‌های مورد نمونه‌گیری بوده است. Ooshiro و همکاران در سال ۲۰۰۸، طی مطالعاتی در اوکیناوای ژاپن نشان دادند که ۱۲ نمونه (۸۰ درصد) از ۱۵ نمونه خون اخذ شده از گاوهای این منطقه در آزمایش PCR بر اساس ژن ۱۶S rRNA به لحاظ *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* مثبت شدند و این اولین گزارش مولکولی وجود *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در ژاپن بوده است. Yang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی‌های خود بر روی گاوهای منطقه‌ی گانسو در شمال غربی چین، میزان آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* را (۳۵ درصد) تعیین نمودند. M'ghirbi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تونس، میزان آلودگی را در گاوها (۰/۹ درصد) تعیین نمودند. Torina و همکاران در سال ۲۰۰۷، در یک بررسی در ایتالیا، میزان آلودگی در گاوها را (۱۶/۷ درصد) تعیین نموده‌اند. همچنین بر اساس تحقیقات انجام گرفته، میزان درصد آلودگی در گواتمالا (۵۱ درصد)، فرانسه (۲۰ درصد) و اسپانیا (۱۳ درصد –۱۹ درصد) می‌باشد (Stuen et al. 2013). این اندازه تفاوت در میزان درصد آلودگی در نقاط مختلف کشور و یا دنیا را می‌توان به شرایط جغرافیایی نسبت داد. همچنین یکی از دلایل بالا بودن آلودگی در

برخی از مناطق، مربوط به گردش فعال باکتری در جمیعت دامی و یا انسانی می‌باشد که سبب بالا بودن جمیعت باکتری در خون می‌گردد (Ladbury et al. 2008). از طرفی، انتقال و شیوع آلودگی گونه‌های مختلف *آناپلاسما* در میان دام‌ها بستگی به فعالیت کنه‌ها و حشرات ناقل دارد (Stuen & Bergstrom, 2001).

توزیع ناقلین و یا حاملین باکتری در جمیعت دامی و یا انسانی یک منطقه در میزان شیوع آلودگی نقش به سزایی دارد (Baráková et al. 2014). Torina و Caracappa در سال ۲۰۰۷، عنوان نمودند که *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* نسبت به سایر گونه‌های *آناپلاسما* طیف وسیع‌تری از میزبان‌ها و مکان‌های جغرافیایی را در بر می‌گیرد و علاوه بر کنه‌ی *ایکسودس رسینوس*، جنس‌های دیگر کنه‌ها نیز ناقل در این انتقال مؤثر می‌باشند. علاوه بر *ایکسودس رسینوس* که در کل اروپا ناقل *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* است انتقال *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در ارتباط با دیگر کنه‌ها نظیر *همافیزالیس پونکتاتا* *ایکسودس پرسولکاتوس* *ایکسودس تری انگولیسپس* و *ریپی سفالوس سانگی نئوس* نیز مطرح است. در ضمن *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* از کنه‌های گونه *ریپی سفالوس پولچلوس* و *ایکسودس ریسینوس* به ترتیب از اتیوپی و تونس جداشده است (Teshale et al. 2016; Sarih et al. 2005). گستردگی آلودگی کنه‌ها، نقش مهمی در شیوع آلودگی *آناپلاسما* در جمیعت دامی دارد. اصولاً فعالیت کنه‌های ناقل *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در مناطق مرطوب بیش‌تر از سایر مناطق می‌باشد (Kocan et al. 2010). مازندران به واسطه دارا بودن آب و هوای خزری و مرطوب، از نقاط مهم فعالیت اکثر کنه‌های خانواده *ایکسودیده* به خصوص *ایکسودس ریسینوس* می‌باشد (Vahedi et al. 2016). لذا درصد بالای آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در این استان نسبت به سایر گونه‌ها دور از انتظار نیست. در این تحقیق درصد آلودگی گاو به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در فصل پاییز، (۳۱/۸ درصد) می‌باشد. در سایر فصول این میزان برابر (۰ درصد) بوده است (Table 4). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). نکته‌ی قابل توجه در این زمینه، نقش ناقلین باکتری و تأثیر تغییرات آب و هوایی بر روی جمیعت ناقلین می‌باشد که نباید از نظر دور نگه داشت (Jonsson and Reid, 2000). مطالعات اخیر نشان داد که پرندگان مهاجر نقش مهمی در پراکنش کنه‌های ناقل آلوده به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* دارند (Matei et al. 2017). از طرفی با توجه به این که وجود *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* توسط محققین مختلف در کنه‌های جنس ایکسودس، *ریپی سفالوس*، همافیزالیس و *هیالوما* اثبات شده است و این کنه‌ها از فراوانی بالایی در دام‌های منطقه‌ی مازندران به خصوص در فصل پاییز برخوردارند (Vahedi et al. 2016)، لذا آلودگی به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در گاوهای استان مازندران در این فصل دور از ذهن نیست. البته در تحقیقات آینده باید شناسایی این عامل در این کنه‌ها دقیقاً مدنظر قرار گیرد. با این‌حال، هنوز نادانسته‌های زیادی در خصوص اپیدمیولوژی این باکتری وجود دارد. در این تحقیق نیز درصد آلودگی *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* در بین گاوها در سنین مختلف به ترتیب کم‌تر از ۱ سال (۰ درصد)، ۱–۳ سال (۲۰/۶ درصد)، ۳ – ۵ سال (۲۵/۵ درصد) و بالای ۵ سال (۱۸/۸ درصد) می‌باشد (Table 4). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نیست (P<۰/۰۵). اصولاً در سنین پایین و کمتر از ۱ سال، به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های مادری، آلودگی باید به مراتب کم‌تر از سنین بالا باشد. از طرفی، در سنین بالا به دلیل این که حیوان زمان بیش‌تری در معرض کنه قرار می‌گیرد، آبستنی‌های مکرر و احتمال همراهی بیش‌تر با حیوانات حامل و حساسیت بیش‌تر حیوانات، درصد آلودگی باید بیش‌تر باشد (Matei et al. 2017). در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* و نوع دامداری (سنتی– نیمه‌صنعتی)، درصد آلودگی به ترتیب در دامداری سنتی (۰ درصد) و نیمه‌صنعتی (۲۶/۹ درصد) به دست آمده است (Table 4). با انجام آزمون کای دو، این تفاوت نیز به لحاظ آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵). اگر چه به دلیل پاره‌ای از مسایل

نظیر تعویض سرسوزن‌های مصرفی، استفاده به موقع از واکسن‌ها، داروها و رعایت بسیاری از مسایل بهداشتی انتظار می‌رود که درصد آلودگی در دامداری‌های سنتی به مراتب بیش‌تر از دامداری‌های نیمه‌صنعتی باشد، با این حال در این تحقیق، درصد آلودگی در دامداری نیمه‌صنعتی بیش‌تر از دامداری سنتی مورد مطالعه می‌باشد. به هر حال ریشه‌ی اصلی این موضوع به رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌های مورد مطالعه برمی‌گردد که به نوعی شاهد شرایط ایده‌آل و استاندارد حتی در دامداری‌های نیمه‌صنعتی نیستیم.

جهت تعیین گونه *آناپلاسما بوویس*، محصول PCR اولیه با جفت آغازگر اختصاصی Anaplasma bovis sense و Anaplasma bovis Antisense برگرفته از ژن S rRNA ۱۶ تکثیر شدند که در نتیجه‌ی آن ۱۲ نمونه (۱۱/۴ درصد) از ۱۰۵ نمونه اولیه به لحاظ *آناپلاسما بوویس* مثبت بوده و باند ۵۵۱ جفت باز تشکیل دادند (Fig 3, Table 3). این تحقیق برای اولین بار، به روش مولکولی و به صورت گسترده وجود گونه *آناپلاسما بوویس* را در گاوهای استان مازندران نشان می‌دهد. Noaman and shayan در سال 2010، طی مطالعاتی به روش مولکولی در مناطق مرکزی ایران، میزان آلودگی گاوها را (۲/۶۶ درصد) تعیین نمودند. با توجه نتایج تحقیقات Pazhoom و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مورد آلودگی طیف وسیعی از کنه‌های سخت استان به *آناپلاسما بوویس* و نظر به فعالیت بالای کنه‌های سخت در جمیعت گاوهای استان مازندران (Vahedi et al. 2016)، لذا آلودگی گاوهای مازندران به باکتری *آناپلاسما بوویس* دور از انتظار نیست. آلودگی در بخش‌های مختلف قاره آسیا از قبیل چین، ژاپن، تایوان و کره جنوبی نیز گزارش شده است (Masuzawa et al. 2014; Ooshiro et al. 2008; Park et al. 2018; Yang et al. 2015). با توجه به (Table 5)، درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در فصول مختلف سال، به ترتیب در بهار (۰ درصد)، تابستان (۰ درصد)، پائیز (۱۸/۲ درصد) و زمستان (۰ درصد) می‌باشد. با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). با توجه به این که طیف وسیعی از کنه‌های سخت به عنوان ناقل *آناپلاسما بوویس* در استان مازندران مطرح می‌باشند (Pazhoom et al. 2016)، لذا این نتیجه دور از انتظار می‌باشد. با تحقیقات گسترده در زمینه‌ی شناسایی آلودگی کنه‌های سخت رایج در منطقه، وضعیت آلودگی به باکتری *آناپلاسما بوویس* روشن‌تر خواهد شد. درصد آلودگی *آناپلاسما بوویس* در بین گاوها و در سنین مختلف به ترتیب کم‌تر از ۱ سال (۰ درصد)، ۱-۳ سال (۲۰/۶ درصد)، ۳-۵ سال (۱۱/۶ درصد) و بالای ۵ سال (۰ درصد) می‌باشد (Table 5). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نیست (P>۰/۰۵). اگر چه در سن بالای ۵ سال درصد آلودگی (۰ درصد) بوده است، اما نتایج حاکی از آن است که با افزایش سن، درصد آلودگی افزایش می‌یابد. افزایش میزان آلودگی در ارتباط با سن می‌تواند ناشی از افزایش احتمال مواجهه با عامل بیماری توسط کنه در مراتع باشد (Rajput et al. 2005). در بررسی ارتباط بین درصد آلودگی گاوهای مورد مطالعه به *آناپلاسما بوویس* و نوع دامداری (سنتی-نیمه‌صنعتی)، به ترتیب در دامداری سنتی (۰ درصد) و نیمه‌صنعتی (۱۵/۴ درصد) به دست آمده است (Table 5). با انجام آزمون کای دو، این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). اگر چه انتظار بر افزایش میزان درصد آلودگی دام‌های سنتی نسبت به دام‌های نیمه‌صنعتی می‌باشد، اما در این تحقیق میزان درصد آلودگی در دام‌های نیمه‌صنعتی بیش‌تر از سنتی است. همان طور که در بحث شیوع *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* نیز به آن اشاره شد، احتمالاً عدم رعایت موازین بهداشتی نظیر عدم تعویض سرسوزن‌ها، مبارزه با کنه‌ها و حشرات ناقل و غیره در دامداری‌های نیمه‌صنعتی، دلیل این نتایج می‌باشد. به هر حال این موضوع نیاز به تحقیق گسترده‌تر دارد.

آناپلاسما مارژیناله، باکتری داخل سلول‌های خونی اجباری می‌باشد که طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را آلوده می‌نماید. به لحاظ اقتصادی، *آناپلاسما مارژیناله* نقش بسیار مهمی در صنعت دامپروری دنیا ایفاء

می‌نماید. علایم بیماری در گاو شامل تب، کاهش وزن و سقط‌جنین می‌باشد. بیماری در دام‌های مسن نسبت به دام‌های جوان، کشنده‌تر می‌باشد (Kocan et al. 2012). بر اساس مطالعات انجام شده طی سال‌های اخیر در ایران، حدود یک‌چهارم گاوهای مورد مطالعه از نظر آناپلاسما *مارژیناله*، مثبت ارزیابی شدند (Noaman, 2017). در تحقیقات ما (۴/۸ درصد) از گاوهای مورد مطالعه، آلوده به باکتری *آناپلاسما مارژیناله* بودند (Table 3). این اولین گزارش از وجود *آناپلاسما مارژیناله* در یک بررسی مولکولی از گاوهای استان مازندران می‌باشد. مطالعات صورت گرفته توسط Noaman و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی گاوهای اصیل و دو رگ یکی از شهرستان‌های استان اصفهان نشان داد که (۱۶/۷ درصد) از گاوها آلوده به *آناپلاسما مارژیناله* بودند. نتیجه‌ی مطالعات ما نشان می‌دهد که در استان مازندران، درصد آلودگی به *آناپلاسما مارژیناله* نسبت به *آناپلاسما فاگوسیتوفیلم* و *آناپلاسما بوویس* کم‌تر می‌باشد (Table 3). در همین راستا، Noaman و Moradi در سال ۲۰۱۹ نیز در تحقیقات خود عنوان نمودند که فراوانی *آناپلاسما مارژیناله* در گاو در مرکز و جنوب غربی کشور به مراتب بیش‌تر از شمال و شمال غرب کشور می‌باشد. همچنین آن‌ها بیش‌ترین میزان فراوانی *آناپلاسما مارژیناله* را در منطقه‌ی بیابانی و ارتفاعات ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ متر از سطح دریا تعیین نمودند. با مطالعه‌ی گسترده بر روی ناقلین (مگس‌ها–کنه‌ها و غیره) و همچنین تأثیر شرایط اکولوژیک، می‌توان الگوی دقیقی از فعالیت این گونه را در استان مازندران فراهم نمود.

آناپلاسما سنتراله نسبت به *آناپلاسما مارژیناله* از شدت بیماری‌زایی کم‌تری برخوردار می‌باشد. علی‌رغم تفاوت در حدت بیماریزایی و محل قرار گرفتن این دو ریکتزیا در گلبول قرمز خون، ازلحاظ آنتی‌ژنتیکی، قرابت بین این دو وجود دارد و به همین خاطر معمولاً از *آناپلاسما سنتراله* به عنوان واکسن زنده برای پیش‌گیری از *آناپلاسموز* در گاو و در کشورهای مثل آفریقای جنوبی و آمریکای لاتین و استرالیا استفاده می‌گردد (Bock et al. 2003). در تحقیق حاضر یک درصد از گاوهای مورد مطالعه، آلوده به باکتری *آناپلاسما سنتراله* بودند (Table 3). نتایج این تحقیق مشابه نتایج تحقیقات Noaman در سال ۲۰۱۳ در استان اصفهان می‌باشد. او برای اولین بار به روش مولکولی، *آناپلاسما سنتراله* (*سویه آموری*) را از خون ۱/۳۳ درصد از گاوهای اصفهان شناسایی نمود.

لازم به ذکر است، علی‌رغم شناسایی گونه‌های مختلف *آناپلاسما* در گاوهای استان مازندران به روش مولکولی، هنوز ناشناخته‌های زیادی در زمینه‌ی ناقلین و حاملین این باکتری وجود دارد. با توجه به شرایط جغرافیایی استان مازندران و نظر به اهمیت آلودگی گونه‌های مختلف *آناپلاسما* در دام‌ها و همچنین امکان آلودگی انسان با گونه‌های شناسایی شده، لزوم تحقیقات گسترده در این زمینه و بررسی میزبانان واسط و مخزن، در استان مورد توجه می‌باشد. از آن جائی که کنه‌ها نقش مهمی در انتقال این دسته از با کتری‌ها ایفاء می‌نمایند، لذا اولین و مهم‌ترین اقدام در راستای کنترل آناپلاسموز در دام‌ها، مبارزه به موقع با کنه‌های ناقل، به خصوص در فصول فعالیت آن‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کلیه‌ی عزیزانی که در نمونه‌گیری و عملیات آزمایشگاهی ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه‌های انجام این پژوهش از طرف مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در قالب زیر پروژه تحقیقاتی ۰/۷-۳۸-۱۸-۹۰۰۰۱۶ تأمین 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

Aubry, P., & Geale, D. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 1-30.

Baráková, I., Derdáková, M., Carpi ,G., Rossom ,F., Collini ,M., Tagliapietra ,V. et al. (2014). Genetic and ecologic variability among Anaplasma phagocytophilum strains, northern Italy. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20:1082–4.

Bashiribod, H., Kazemi ,K., Eslami ,G., Bigdeli, S., Bandehpour, M., Rahbarian ,N., et al.(2004). First molecular detection of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks in Iran. *Journal of medical sciences.* 2004; 4(4): 282-286.

Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., Carter ,P.D. (2003). Assessment of a low virulence Australian isolate of Anaplasma marginale for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by Boophilus microplus. *Veterinary Parasitology*, 118, 121–131.

Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, E., Paradies, P., Elia, G., Martella, V., . . . Ceci, L. (2008). First report of bovine anaplasmosis caused by anaplasma centrale in europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 107-110

Dumler, J. S., Madigan, J. E., Pusterla, N., & Bakken, J. S. (2007). Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical infectious diseases*, 45(Supplement_1), S45-S51

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

Engvall, E.O., & Egenvall, A. (2002). Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. *International Journal of Medical Microbiology* 291: 100-103.

Jonsson, N. N., and S. W.J. Reid. (2000). Global climate change and vector borne diseases.*The Veterinary Journal*.160, 87–89

Kocan, K.M., de la, F. J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A. (2010). The natural history of Anaplasma marginale. *Veterinary Parasitology*. 2010; 167:95–107.

Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F. (2008). Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 916:501–9.

Kocan, K. M., De la ,F. J., Guglielmone, A. A., & Meléndez, R. D. (2003). Antigens and alternatives for control of anaplasma marginale infection in cattle. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 698-71

Ladbury, G. A., Stuen, S., Thomas, R., Bown, K. J., Woldehiwet, Z., Granquist, E. G., . . . Birtles, R. J. (2008). Dynamic transmission of numerous anaplasma phagocytophilum genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1686-1691

Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., . . . Yin, H. (2012). Molecular survey and genetic identification of anaplasma species in goats from central and southern china. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 464-470

Masuzawa, T., Uchishima, Y., Fukui, T., Okamoto, Y., Pan, M. J., Kadosaka, T., & Takada, N. (2014).Detection of anaplasma phagocytophilum and anaplasma bovis in small wild mammals from taichung and kinmen island, taiwan. *Japanese journal of infectious disease* .67, 111-114, 2014

Matei, I. A., Ionică, A. M., D'Amico, G., Corduneanu, A., Daskalaki, A. A., Lefkaditis, M., & Mihalca, A. D. (2017). Altitude-dependent prevalence of canine granulocytic anaplasmosis in romania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.17 (2):147-151.

M'ghirbi, Y., Yaïch, H., Ghorbel, A., & Bouattour, A. (2012). Anaplasma phagocytophilum in horses and ticks in tunisia. *Parasites & Vectors*, 5(1), 1-7

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).

Noaman, V. (2013). Report of anaplasma centrale (amori strain) in cattle in iran. *Pajouhesh-va-Sazandegi Veterinary Journal*, 98, 26-29. (In Persian).

Noaman, V.,& 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

Noaman, V., & Shayan, P. (2010). Molecular detection of anaplasma bovis in cattle from central part of iran. *Veterinary Research Forum* Vol: 1, No: 2, September, 2010, 117 - 122

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

Noaman, V., S. Arabzadeh and B. Kachooei. (2002). A study on Anaplasmosis in cattle of Falavarjan city, Isfahan province (1995- 200). *Pajouhesh – Va- Sazandegi* 51:10-12. (In Persian).

Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Katagiri, Y., Inokuma, H. (2008). Detection of Anaplasma bovis and Anaplasma phagocytophilum from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology* 154: 360–364

Pace, J., & Wakeman, D. (2003). Determining the age of cattle by their teeth, university of florida, ifas extension.

Park1, J., Han, D. G., Ryu, J .H., Chae, J. B., Chae J,S.b., Yu, D .H., . . . Choi ,K. S. (2018). Molecular detection of Anaplasma bovis in Holstein cattle in the Republic of Korea. *Acta Veterinaria Scandinavica* (2018) 60:15

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

Rajput. Z.I., Hu Song-hua, A.G.,Arijo, H., Habib and K Khalid, (2005). Comparative study of Anaplasma parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *Journal of Zhejiang University-Scince A, 6B*: 1057-1062.

Renneker, S., Abdo, J., Salih, D.E.A., Karagenc, T., Bilgic, H., Torina, A et al. (2013). Can Anaplasma ovis in small ruminants be neglected any longer? *Transboundary and Emerging Diseases.* 2013; 60:105–12.

Rymaszewska, A. (2011). PCR For detection of tick-borne Anaplasma phagocytophilum pathogens*: a review. Veterinarni Medicina*. 2011; 56:529–36.

Sarih, M., M'Ghirbi, Y., Bouattour, A., Gern, L., Baranton, G., Postic, D. (2005). Detection and identification of Ehrlichia spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43:1127–32.

Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C. (2013). Anaplasma phagocytophilum – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2013; 3:1127–32.

Stuen, S. (2007). Anaplasma phagocytophilum-the most widespread tick-borne infection in animals in europe. *Veterinary research communications*, 31(1), 79-84

Stuen, S., Bergström, K., Petrovec, M., Van de Pol, I., & Schouls, L. M. (2003). Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of anaplasma phagocytophilum in sheep. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(4), 692-695

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

Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). Pcr-diagnosis of anaplasma marginale in cattle populations of ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16s fragments. BMC *veterinary research*, 13(1), 1-7

Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Bogale, K., Dorny, P., & Berkvens, D. (2016). Molecular detection of anaplasma species in questing ticks (ixodids) in ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(6), 449-452

Torina, A., Caracappa, S. (2007). Anaplasmosis in cattle in Italy.*Veterinary Research Communications*, 31(Suppl.1): 73–78.

Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., Scimeca, S., Turlá, R., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S. & De La Fuente, J. (2007). Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses and Public Health*. 2007; 54:8–15.

Vahedi Noori, N. Abdi, G, M., Mohammad Nejad, K. Sh. (2016). Evaluation of the species diversity and abundance of hard ticks (Family: Ixodidae) parasite of cattle and sheep in Mazandaran province. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)* No 106 pp: 58. (In Persian).

Weisburg, W. G., Barns, S .M ., and Pelletier, D .A., (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173: 697-703.

Yang, J., Li, Y., Liu, Z., Liu, J., Niu, Q., Ren, Q Yang, J., Li, Y., Liu, Z., Liu, J., Niu, Q., Ren, Q., Chen, Z., Guan, G., Luo, J. & Yin, H. (2015). Molecular detection and characterization of anaplasma spp. In sheep and cattle from xinjiang, northwest china. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-7.

Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Liu, Q., Li, Y., Chen, Z., Ma, M., Liu, A., Ren, Q., Luo, J. & Yin, H. (2013). Prevalence of anaplasma phagocytophilum in ruminants, rodents and ticks in gansu, north-western china. *Journal of medical microbiology*, 62(2), 254-258

Received: 18.08.2019
Accepted: 25.12.2019

Vol. 17, No. 2, Summer, 2021 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2019.197984.2177
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.12.5

Molecular prevalence of *Anaplasma* species in Cow of Mazandaran province

Nasrollah Vahedi Nouri[1*] and Vahid Noaman[2]

[1] Assistant professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[2] Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 18.08.2019 Accepted: 25.12.2019

Abstract

This study aimed to determinate the variety of *Anaplasma* species among cows of Mazandaran province. For this purpose, 105 blood samples randomly collected via the jugular vein from different parts of Mazandaran province. The extracted DNA from blood cells was amplified by *Anaplasma*-all primers, which amplify an approximately 1468bp DNA fragment from a region of the 16S rRNA gene from various members of the genus *Anaplasma*. 29 (27.6%) out of 105 cow blood samples were *Anaplasma* spp. positive by first PCR and nested PCR. All cow positive samples were analysed for the presence of *A. phagocytophilum*, *A.bovis*, and *A.centrale (Amori Strain)* and as a result, 22 of blood samples (21%) for *A.phagocytophilum*, 12 (11.4%) for *A.bovis* and 1(1%) for *A.centrale* were positive. The extracted DNA from positive *Anaplasma spp* samples were amplified by *Anaplasma marginale* specific primers, which amplify an approximately 866bp DNA fragment from a region of the *msp4* gene. Out of 105, blood samples, Five (4.8%) were positive for *Anaplasma marginale*. This study is the first molecular detection of *Anaplasma* species from cows in Mazandaran province. The results show that there is a significant difference between the percentage of infection of the cow with *Anaplasma phagocytophilum*, in different seasons of the year and the livestock type. Also, the percentage of infection with *Anaplasma bovis*, among the variables studied; there is a significant difference between the seasons of the year and the type of livestock.

Key words: Molecular Prevalence, *Anaplasma* species, Cow, Mazandaran

* **Corresponding Author**: Nasrollah vahedi Nouri, Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
E-mail: nsvahedi@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).