

تشخیص آلودگی گاو میش‌های بومی به تیلریا اوریتالیس در استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های مولکولی و میکروسکوپی

بابک نریمانی^۱، ناصر حقوقی راد^{۲*}، پرویز شایان^۳، صادق رهبری^۴، کسری اسمعیل‌نیا^۴

۱- دانش‌آموخته دکترای دستیاری، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، تهران، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- استاد بخش تحقیق و تولید واکسن انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: hoghoohirad@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۷/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۱/۱۹)

چکیده

عامل ایجادکننده بیماری تیلریوز در گاو‌ها، انگل تک‌یاخته‌ای خونی داخل سلولی اجباری به نام تیلریا آنولاتا بوده که باعث کم‌خونی شدید، خیز شدید ریه‌ها و به‌خصوص در دام‌های غیربومی موجب مرگ سریع می‌شود. هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاو میش‌های بومی و ارتباط آن با عوامل محیطی در چهار شهر استان آذربایجان غربی با روش‌های میکروسکوپی و مولکولی بود. به‌طور تصادفی ۲۹۱ نمونه خون از گاو میش‌های منطقه از اسفند ۱۳۹۲ تا تیر ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. روش‌های PCR مستقیم و semi-nested PCR برای ارزیابی DNA گونه‌های انگل تیلریا با استفاده از جفت پرایمرهای ویژه جزء rRNA-18S مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی میکروسکوپی، حضور این انگل در ۴ رأس گاو میش (۱/۳۷ درصد از گاو میش‌های مورد آزمایش) تأیید گردید. بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که نمونه‌های خون در ۴ مورد از ۲۹۱ رأس گاو میش (۱/۳۷ درصد از موارد) به انگل تیلریا آنولاتا (*Theileria annulata*) آلوده بودند. همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس گاو میش ماده بالغ (۰/۶۸ درصد از گاو میش‌های مورد آزمایش) به‌طور هم‌زمان به گونه تیلریا اوریتالیس (*Theileria orientalis*) هم آلوده بوده‌اند. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی گاو میش به تیلریا آنولاتا در روش مولکولی به ترتیب ۱/۳۷ و ۱ درصد به‌دست آمد. شانس آلودگی به گونه‌های تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس برابر بود. شیوع مولکولی تیلریا آنولاتا در شهرهای ارومیه و سلماس به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($p < 0/05$). شیوع مولکولی تیلریا اوریتالیس در شهر ارومیه ۲/۲ درصد برآورد شد. این مطالعه برای اولین بار تأیید کرد که انگل تیلریا اوریتالیس در گاو میش‌های بومی شهر ارومیه ایران وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: تیلریا اوریتالیس، گاو میش، آزمایش میکروسکوپی، تشخیص مولکولی، آذربایجان غربی.

مقدمه

مروزیوئیت های آزاد در سیتوپلاسم تبدیل به پیروپلاسم می گردند. از طرف دیگر سلول هایی در گردش خون محیطی و طحال نیز وجود دارند که می توانند تکثیر انگل را در داخل لنفوسیت، محدود کنند و یا حتی سلول های هدف را از بین ببرند (Ahmad and Melhorn, 1999; Bishop *et al.*, 2004; Shaw, 2002; Striepen *et al.*, 2007). باید توجه گردد که روش تشخیص انتخابی انگل مذکور فقط در مرحله ابتدای بیماری، تهیه گسترش از عقده لنفاوی و مشاهده آن به وسیله میکروسکوپ نوری می باشد. اما گزارش شده که استفاده از روش PCR در نمونه خون، می تواند آلودگی را در مرحله مزمن نیز مشخص کند، حتی اگر همان دام ها با استفاده از روش PCR بر روی نمونه های عقده های لنفاوی، از نظر آلودگی مذکور، منفی تشخیص داده شوند (Ahmad and Melhorn, 1999).

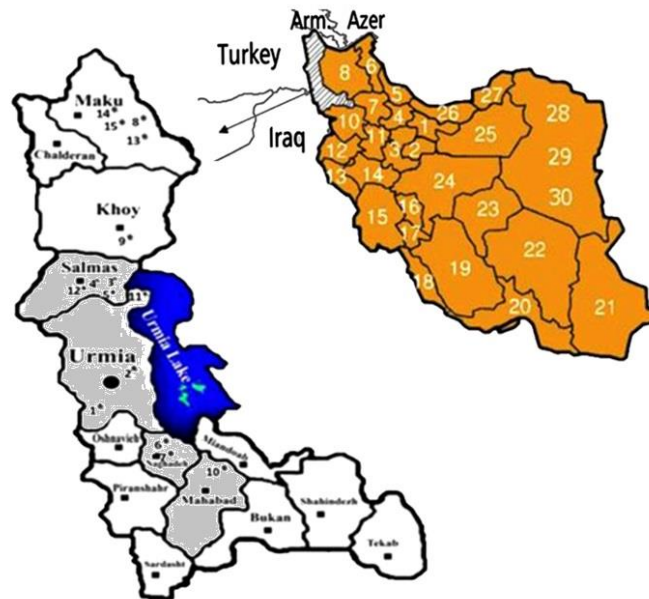
هفت گونه از انگل جنس تیلریا می توانند خانواده گاوان را آلوده کنند که از بین آنها تیلریا پاروا، تیلریا آنولاتا و تیلریا ولیفرا در گاو میش معمولاً ایجاد علائم بیماری می کنند. البته بیماری ایجاد شده توسط تیلریا اوریتتالیس از لحاظ درمانگاهی اغلب ملایم و یا کم علامت می باشد (Hoseini *et al.*, 2003) (جدول ۱). شکل اسپوروزوایت انگل تیلریا، عقده لنفاوی مجاور محل خونخواری را آلوده می کند و در سیتوپلاسم سلول های لنفاوی مستقر می گردد. اسپوروزوئیت ها با تکثیر به روش شیزوگونی، شیزونت های (موسوم به اجسام آبی کخ) ایجاد می کنند. این شیزونت ها تبدیل به مروزیوئیت های چند هسته ای شده و مروگونی باعث پارگی لنفوسیت و رهایی مروزیوئیت ها از آن و نفوذ به گلبول های قرمز می شود. سپس

جدول ۱- گونه های انگل تیلریا که در گاو میش ایجاد آلودگی می کنند

گونه	پراکندگی	بیماری زایی	ناقل بندپای احتمالی در ایران	میزبان
تیلریا آنولاتا (دیسپار)	شمال آفریقا، جنوب اروپا، خاورمیانه، هند و جنوب شوروی سابق	تیلریوز گرمسیری، تب ساحل مدیترانه ای، تب مصری	هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم هیالوما مارژیناتوم مارژیناتوم هیالوما مارژیناتوم تورانیکوم هیالوما دتریتوم	گاو میش
تیلریا پاروا (لارنسی) (بویس)	شمال شرق و مرکز آفریقا	تب ساحل شرقی آفریقا، کوریدور گاو، ژانویه زمیبابوه، تب کنه ای رودزایی	ریبی سفالوس آپندیکولاتوس ریبی سفالوس زمبزیسیس	گاو میش
تیلریا ولیفرا	صحرای جنوب آفریقا و جزایر کاراییب	تیلریوز به ظاهر خوش خیم	آمبلیوما وارینگتوم همافیزالیس پونکتاتا همافیزالیس سینابارینا	گاو میش
تیلریا اوریتتالیس	استرالیا، آفریقا، ایالات متحده، آسیا و اروپا	تیلریوز	همافیزالیس ژانپیکوم همافیزالیس کومسینا همافیزالیس هومروسال	گاو میش

نخجوان و ارمستان ۱۳۵ کیلومتر است. فاصله شهر ارومیه تا مرز سرو (مرز ترکیه) هم حدود ۵۵ کیلومتر می‌باشد (شکل ۱).

استان آذربایجان غربی از نظر شرایط جوی دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های معتدل می‌باشد و تحت تأثیر اقلیم نیمه‌مدیترانه‌ای است. طول مرز این استان با کشورهای ترکیه ۴۸۸ کیلومتر، عراق ۲۰۰ کیلومتر،



شکل ۱- نقشه استان آذربایجان غربی در تقسیمات کشوری و شهرهای مورد مطالعه

آذربایجان غربی (مهاباد، نقده، ارومیه و سلماس) با روش‌های میکروسکوپی (بررسی گسترش خونی) و مولکولی (استفاده از روش PCR) بود.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری: نظر به این که آلودگی گاومیش‌ها نامشخص بود و از طرف دیگر با در نظر داشتن مقاومت طبیعی گاومیش‌ها در مقابل اغلب بیماری‌های انگلی، تصمیم گرفته شد از احتمال یک درصد آلودگی استفاده شود. بنابراین برای تعیین تعداد نمونه‌های مورد

در سال ۱۳۹۴ در ارومیه مطالعه‌ای روی ۱۳۸ رأس گاومیش از نظر آلودگی به تیلریا صورت گرفت (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016) که نتایج آزمایشات میکروسکوپی و مولکولی ایشان نشان داد که دام‌های مذکور از نظر آلودگی به انگل گونه تیلریا آنولاتا مثبت ولی از نظر آلودگی به گونه تیلریا اوریتالیس منفی بودند. بررسی‌ها نشان داد که به‌غیر از این تحقیق، مطالعه دیگری در ایران بر وجود آلودگی به انگل تیلریا در گاومیش‌ها صورت نگرفته است. لذا هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاومیش‌های بومی به گونه‌های انگل مذکور در چهار شهر بزرگ استان

آزمایش در استان آذربایجان غربی با درجه اطمینان ۹۵ درصد و خطای مطلق ۵ درصد، در خصوص مجموع تقریبی ۴۰ هزار رأس گاومیش بومی موجود در منطقه، محاسبات لازم صورت گرفت (Thrusfield, 2005) و با همکاری شبکه‌های دامپزشکی و با استفاده از یک پرسش‌نامه از اسفند ماه سال ۱۳۹۲ تا تیرماه سال ۱۳۹۳ از تعداد ۲۹۱ رأس گاومیش شامل: ۱۹۴ رأس (۶۷ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نر و ۹۷ رأس (۳۳ درصد از دام‌های مورد آزمایش) ماده، از ۴ شهر استان شامل مهاباد، نقده، ارومیه و سلماس نمونه‌برداری شد.

از این تعداد، ۲۱۰ رأس (۷۲ درصد از دام‌های مورد آزمایش) بالغ و ۸۱ رأس (۲۸ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نابالغ با ظاهر سالم و دارای سن ۶ ماه تا ۱۰ سال، ۷۳ رأس از مهاباد، ۷۳ رأس از نقده، ۷۲ رأس از ارومیه و ۷۳ رأس از سلماس به صورت تصادفی انتخاب شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد نیاز برای انجام مطالعه حاضر، از گاومیش‌هایی اخذ شدند که منحصراً در همان استان تولد یافته و نگه‌داری می‌گردیدند.

برای انجام آزمایشات، از هر رأس دام، پنج میلی‌لیتر نمونه خون وریدی محیطی، پس از ضدعفونی کردن محل، اخذ گردیده و بلافاصله دو گسترش نازک با استفاده از لام‌های شیشه‌ای از هر نمونه خون تهیه می‌شد. سپس با ریختن متانول خالص (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ, USA) روی گسترش‌های خشک‌شده و گذشت پنج دقیقه، گسترش‌ها تثبیت می‌گردید. همزمان و سریعاً باقی‌مانده هر نمونه در لوله شیشه‌ای ونوجکت (venoject) تمیز ریخته شده و هم حجم آن اتانول (MERCK & Co.,

مطالعه میکروسکوپی: گسترش‌های خونی بعد از تثبیت با متانول به مدت ۴۵ دقیقه با محلول گیمسای ۵ درصد در بافر فسفات سالین پوشانده شدند (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016). مشاهده شکل پیروپلاسمی (piroplasm) انگل تیلریا در داخل گلبول‌های قرمز موجود در گسترش‌های تهیه‌شده، به عنوان مثبت بودن آلودگی و عدم مشاهده آن‌ها در ۱۰۰ «میدان دید» میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی بالا (۱۰۰۰×) در هر گسترش به عنوان منفی بودن آلودگی، تلقی می‌گردید (Aktas et al., 2006). از آنجا که تفکیک گونه‌ها با میکروسکوپ معمولی، تشخیصی قطعی نمی‌باشد، به همین دلیل از روش مولکولی نیز استفاده گردید (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

مطالعه مولکولی: استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از مجموعه ابزار و مواد کیت استخراج ساخت مؤسسه (PCR Purification Kit, MBST; Iran) طبق دستور عمل شرکت سازنده انجام گرفت. این روش بر اساس اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیسی حامل تعبیه‌شده در ستون پلاستیکی spin ساخت مؤسسه مذکور عمل می‌کند. به طور خلاصه، ابتدا مقدار بسیار کمی از لخته خون کامل با قاشقک تمیز برداشته شده و در داخل دیواره یک میکروتیوب اپندورف (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) تمیز ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده می‌شد. این لوله‌های اپندورف به مدت یک شب در دمای اتاق (با در باز) به دور از هر آلودگی نگه داشته می‌شدند تا کاملاً خشک و بدون چسبندگی و البته

عاری از الکل گردند. در روز بعد، نمونه‌ها در حضور آنزیم پروتئیناز K در دمای ۵۵ درجه سلسیوس با افزودن ۱۸۰ میکرولیتر بافر لایزس (lysis buffer)، به محلولی کاملاً یکنواخت تبدیل می‌شدند. سپس با افزودن ۳۶۰ میکرولیتر بافر بایندینگ (binding buffer) به هر نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در معرض حرارت مرطوب ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده می‌شدند. در ادامه ۲۷۰ میکرولیتر اتانول مطلق (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA spin محتوای ستون، دو بار با بافر شستشو در سانتیفریوژی (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) با ۸۰۰۰ دور در دقیقه تصفیه می‌گردید. سپس با استفاده از بافر الوسیون (elution buffer) DNA استخراج‌شده از هر نمونه به‌طور جداگانه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به حالت منجمد نگه‌داری می‌شد. در نهایت DNA استخراجی از هر نمونه روی ژل آگارز (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA) ۱/۵ درصد، الکتروفورز (PCR

مورد بررسی قرار می‌گرفت (Shayan and Rahbari, 2005).
انجام PCR و Nested-PCR:
 طراحی پرایمرها: گام اول در انجام آزمایش PCR، طراحی پرایمرهای مناسب جهت تکثیر ژن مورد نظر است. پرایمرها اولیگونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای هستند که مکمل قسمتی از DNA بوده و به رشته DNA الگو متصل می‌شوند. آنزیم DNA پلی‌مراز در امتداد آغازگر، از سمت پایانه 5' رشته DNA الگو، مکمل رشته الگو را سنتز می‌کند (Hoghooghi-Rad et al., 2011) (جدول ۲).
 در ابتدا جهت ارزیابی و اطمینان از قابلیت عملی DNA، هر یک از نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی P1 و P2 مشتق‌شده از ژن کدکننده پروتئین بتا‌اکتین (CinnaGen, Tehran; Iran) مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۲- نام و مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده

نام پرایمر	ژن هدف	ترتیب نوکلئوتیدی پرایمرها (۳-۵)	ویژگی
Bba-S (P1)	بتا‌اکتین گاوی	CCT-AGA-GAG-AAG-CGG-GGT-G-<G>	جهت تکثیر ژن رمزگشای بتا‌اکتین گاوی
Bba-A (P2)	بتا‌اکتین گاوی	ATC-ACT-GCC-CTG-GCA-CCC-A-<G>	جهت تکثیر ژن رمزگشای بتا‌اکتین گاوی
Tbs-S (P3)	18S rRNA	CAC-AGG-GAG-GTA-GTG-ACA-AG	ویژه گونه‌های تیلریا و گونه‌های بابریا
Tbs-A (P4)	18S rRNA	CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA-G	ویژه گونه‌های تیلریا و گونه‌های بابریا
Ta-S (P5)	18S rRNA	ACG-GAG-TTT-CTT-TGT-CTG-<A>	ویژه تیلریا آنولاتا
To-S (P6)	18S rRNA	ACA-TTT-CTC-TTG-TTT-GAG-<T>	ویژه تیلریا اوریتتالیس

ارزیابی DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):
 مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو Master mix، ۲- محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای Bba-S (P1)(20μM), Bba-A (P2) (20μM) (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۴- آب دو بار تقطیر شده استریل.

روش آزمایش: بر روی کیسه یخ، در داخل هر میکروتیوب میزان ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر Bba-A و Bba-S(P1)(20μM) و (P2)(20μM) و آب به اندازه نه میکرولیتر و ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو ریخته شد تا حجم نهایی محتوای میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر باشد و بلافاصله در دستگاه ترموسایکلر (Termal Cycler, Bio Rad; USA) با برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام می‌گرفت. نکته مهم این است که در قسمت اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو یا (annealing) در هر مرحله از طول کار، می‌توان درجه حرارت را ۲-۳ درجه سانتی‌گراد بیشتر تنظیم کرد تا محصول نهایی دستگاه کیفیت بالاتری داشته باشد (Hoghooghi-Rad et al., 2011).
 برنامه دستگاه ترموسایکلر:

مرحله ۱: به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس: واسرشت (denaturation)
 مرحله ۲:

دو سری:

۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت

۹۰ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو (annealing)

۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولی شدن پرایمرها یا زمان ساخت (extention)

دو سری:

۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت

۶۰ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو

۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولی شدن پرایمرها یا زمان ساخت

سی و چهار سری:

۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت

۴۵ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو

۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولی شدن پرایمرها یا زمان ساخت

مرحله ۳: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس: زمان ساخت تکمیلی

بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

اندازه محصول PCR در این مرحله ۶۳۹ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

تشخیص تک یاخته در خون با استفاده از روش PCR: به علت تنوع خاص گونه‌ای موجود در ژن حفاظتی (18SrRNA) از آن به‌عنوان یک شاخص در تشخیص دقیق گونه انگل‌ها، طبقه‌بندی تاکسونومیک و تحقیقات فیلوژنیک بهره‌برداری می‌شود (Salim et al., 2010).

مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو، ۲- Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای CinnaGen, Tbs-S (20μM), Tbs-A (20μM) (Tehran; Iran)، ۴- آب دو بار تقطیر شده استریل.

اندازه محصول PCR نمونه‌های خونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4)

اگر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این گونه، چیزی تکثیر نگردد، باید متوجه بود که احتمال حضور گونه ای دیگر در نمونه وجود خواهد داشت (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011).

بررسی حضور تیلریا آنولاتا با استفاده از روش مولکولی:

مواد مورد نیاز:

- ۱) فقط آن محصول PCR که مثبت شده
 - ۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)
 - ۳) پرایمرهای (P5)(20 μ M) Ta-S و Tbs-A (P4)(20 μ M) (CinnaGen, Tehran; Iran)
 - ۴) آب دو بار تقطیر شده استریل
- روش آزمایش:

بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی Ta-S (P5) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند.

اندازه محصول در این مرحله برای تیلریا آنولاتا ۱۹۳ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011).

بررسی حضور تیلریا اوریتالیس با استفاده از روش مولکولی:

مواد مورد نیاز:

- ۱) فقط آن محصول PCR که در دو مرحله قبل مثبت شده است.

منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA آزموده شده و در خانواده بابزی ایده بین ۴۰۰-۳۹۰ جفت باز می باشد، در صورتی که در خانواده تیلری ایده ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز است (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011).

Nested-PCR -

- حساسیت این روش بسیار بالاتر از روش PCR معمولی است.

- ویژگی آن بالاتر از روش PCR معمولی می باشد (به علت وجود پرایمرهای داخلی).

- چون در این روش، محصول به دست آمده از واکنش اول، به لوله جدیدی انتقال می‌یابد در صورت وجود موانعی برای PCR، غلظت آن نمونه‌ها کاهش می‌یابد (Shah Hoseini and Seyed Reza Tehrani, 2001).

- انجام Semi-nested PCR:

این روش کاملاً مشابه Nested-PCR می‌باشد ولی در آن فقط یکی از پرایمرها داخلی است و پرایمر دیگر، همان پرایمر اولیه می باشد. در مطالعه‌ای معلوم گردید که می‌توان از گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده نیز DNA را استخراج و بررسی کرد. یعنی با استفاده از روش مولکولی به طور همزمان گونه‌های تک‌یاخته را تفکیک کرد (Shayan and Rahbari, 2005).

موارد مثبت محصول PCR مرحله قبل، با پرایمرهای Ta-S (P5) و Tbs-A (P4) در این آزمایش مورد بررسی قرار می‌گیرند. نتایج این مرحله با الکتروفورز بر روی ژل آگارز نشان خواهد داد که چه تعداد از موارد مثبت مرحله قبل، منحصراً آلوده به تیلریا آنولاتا می‌باشند.

گرفتند. به منظور تحلیل داده‌ها از آزمون «مربع کای» (Chi square test) استفاده گردید. $p=0/05$ مبنای قضاوت آماری در نظر گرفته شد. جهت تعیین درجه همبستگی بین دو روش مولکولی و روش میکروسکوپی در این بررسی، «ضریب توافق کاپا» محاسبه شد.

یافته‌ها

- مطالعه میکروسکوپی: آشکال پیروپلاسمی تیلریا در نمونه‌های ۴ رأس دام بالغ از ۲۹۱ رأس گاو میش (۱/۳۷ درصد)، ۲ رأس دام نر (۱ درصد) و ۲ رأس دام ماده (۲ درصد) مشاهده شد.

- مطالعه مولکولی: با استفاده از هشت پرایمری که در جدول ۲ مشخص شده، مطالعه مولکولی نشان داد که از کل نمونه‌ها، چهار رأس گاو میش بالغ شامل دو رأس نر (یک درصد) و دو رأس ماده (دو درصد) از ۲۹۱ رأس (۱/۳۷ درصد) به تیلریا آنولاتا آلوده بودند (شکل‌های ۲ و ۳).

(۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)

(۳) پرایمرهای (P6) 20µM To-S و Tbs-A (P4) 20µM (CinnaGen, Tehran; Iran)

(۴) آب دو بار تقطیر شده استریل
روش آزمایش:

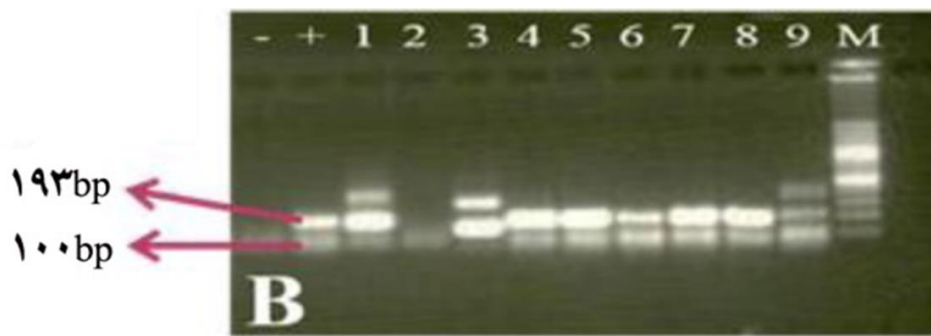
بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی (P6) To-S و (P4) Tbs-A منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند.

اندازه محصول در این مرحله برای تیلریا اوریتالیس ۲۳۵ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار (SPSS Inc.'Chicago'IL'USA) نسخه ۲۲ به طور توصیفی و تحلیلی مورد بررسی قرار



شکل ۲- نتایج تکثیر DNAهای استخراج شده با پرایمرها



شکل ۳- نتایج تفکیک DNA تیلیریا آنولاتا با پرایمرهای مربوطه

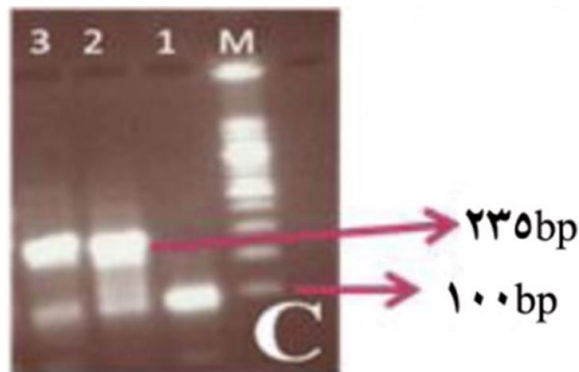
جدول ۳- مقایسه دو روش تشخیص تیلیریا آنولاتا در گاومیش استان

آلودگی در روش میکروسکوپی				
جمع	منفی	مثبت		
۴	۰	۴	مثبت	
۲۸۷	۲۸۷	۰	منفی	آلودگی در روش مولکولی
۲۹۱	۲۸۷	۴	جمع	

نشان‌دهنده وجود همبستگی ۱۰۰ درصد بین این دو روش در تشخیص آلودگی گاومیش به تیلیریا آنولاتا می‌باشد.

همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس (۰/۶۸ درصد) گاومیش ماده بالغ (دو درصد) به طور هم زمان به تیلیریا اوریتالیس نیز آلوده بوده‌اند (شکل ۴). آلودگی به گونه های تیلیریا آنولاتا و تیلیریا اوریتالیس برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲/۲-۲/۳ درصد) بود ($p < 0.05$).

حساسیت و ویژگی روش میکروسکوپی در مقایسه با روش مولکولی (جدول ۳) به ترتیب یک و یک بود و ارزش اخباری موارد مثبت و منفی روش میکروسکوپی به ترتیب یک و یک برآورد شد. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی به تیلیریا آنولاتا در روش مولکولی به ترتیب ۱/۳۷ درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۳۷-۱/۳۷ درصد) و یک درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۰-۲/۳ درصد) بود. ضریب توافق کاپا بین دو روش مولکولی و روش میکروسکوپی معادل ۱۷/۰۵ به دست آمد که



شکل ۴- نتایج تفکیک DNA تیلریا اوریتتالیس با پرایمرهای مربوطه

ارومیه ۲/۲ درصد بود. در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری را بین آلودگی این دو منطقه به انگل نشان نداد. ارتباط معنی‌داری بین موقعیت جغرافیایی و آلودگی مشاهده نگردید (جدول ۴).

از لحاظ حضور انگل به تفکیک شهرها، آلودگی به تیلریا اوریتتالیس در گاومیش‌های ارومیه اثبات گردید ولی این تک‌یاخته در نمونه‌های شهرهای سلماس و مهاباد و نقده مشاهده نشد. شیوع مولکولی تیلریا آنولاتا در شهرهای ارومیه و سلماس به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود. شیوع مولکولی تیلریا اوریتتالیس نیز در شهر

جدول ۴- نتایج تعیین مولکولی تک‌یاخته به تفکیک اقلیم مناطق استان

درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	تعداد نمونه	نوع و محل منطقه
۱/۳	۲	۱۴۶	خشک: مهاباد، سلماس
۲/۷	۴	۱۴۵	مرطوب: ارومیه، نقده

آلودگی این دو منطقه به تیلریا آنولاتا نشان نمی‌دهد (جدول ۵).

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، ارتباط معنی‌داری را بین

جدول ۵- نتایج تعیین مولکولی تیلریا آنولاتا به تفکیک اقلیم مناطق استان

درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	تعداد نمونه	نوع و محل منطقه
۱/۳	۲	۱۴۶	خشک: مهاباد، سلماس
۱/۳	۲	۱۴۵	مرطوب: ارومیه، نقده

را بین آلودگی این دو منطقه به تیلریا اوریتتالیس نشان نداد (جدول ۶).

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، نیز ارتباط معنی‌داری

جدول ۶- نتایج تعیین مولکولی تیلریا اوریتتالیس به تفکیک اقلیم مناطق استان

نوع و محل منطقه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	درصد آلودگی
خشک: مهاباد، سلماس	۱۴۶	۰	۰/۰۰۰
مرطوب: ارومیه، نقده	۱۴۵	۲	۱/۳

بحث و نتیجه‌گیری

این گزارش، نخستین گزارش آلودگی گاومیش به تیلریا اوریتتالیس توسط روش مولکولی در ایران است. همچنین نتایج آزمایش‌های مولکولی نشان داد که تیلریا آنولاتا شایع‌ترین گونه انگل در گاومیش‌های استان آذربایجان غربی می‌باشد. در این بررسی، برای اولین بار آلودگی هم‌زمان با گونه‌های تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا در گاومیش‌های منطقه شمال غربی ایران مشاهده شد. پیش از این، آلودگی هم‌زمان با گونه‌های تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا فقط در گاو با روش مولکولی در ایران گزارش شده بود (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011). تیلریا اوریتتالیس نخستین بار در گاو بومی ایران توسط روش سرمی تفکیک و گزارش شده بود (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984). یافته‌های ما در موافقت با نتایج پژوهش اویلنبرگ و هاشمی فشارکی است که انتقال تیلریا اوریتتالیس را در گاوهای شمال ایران، به وسیله کنه همافیزالیس پونکتاتا گزارش نموده بودند (Hashemi-Brown, 1990). علاوه بر این، حضور تیلریا اوریتتالیس در استان گلستان واقع در شمال ایران، می‌تواند فرضیه انتشار گسترده این تک یاخته را در بخش‌های شمالی کشور تقویت کند (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011). بالاترین میزان

آلودگی دام‌ها به تیلریا آنولاتا در ایران در استان خوزستان تا ۶۵/۸۳ درصد و در استان مجاور شرقی آن، کهگیلویه و بویر احمد تا ۵۷/۴۴ درصد در سال ۱۳۸۹ گزارش گردیده است که در این مورد، احتمال انتشار آلودگی انگلی در اثر حمل و نقل دام در همسایگی استان‌ها و در مسافت نزدیک، به ذهن خطور می‌کند (Safarpoor-Dehkordi *et al.*, 2012).

البته بر اساس بررسی‌ها، گونه تیلریا آنولاتا در گاوهای شرق ترکیه، در مجاورت شمال استان آذربایجان غربی با فراوانی ۴۵ درصد و گونه‌های گروه تیلریا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اوریتتالیس با فراوانی ۷ درصد وجود دارند (Aktas *et al.*, 2006).

همچنین در منطقه کردستان کشور عراق، واقع در مجاورت شهرهای جنوبی استان، میزان آلودگی گاوها به تیلریا آنولاتا با روش مولکولی ۶۸/۹ درصد گزارش شده است (Al-Saeed *et al.*, 2010). احتمال تأثیر حمل و نقل در مسافت نزدیک، بر انتشار این انگل از طریق کنه ناقل در بین دام‌های منطقه، بعید به نظر نمی‌رسد. وجود آلودگی در کشور ترکیه به تیلریا اوریتتالیس و مرز طولانی استان آذربایجان غربی با کشور ترکیه (۴۸۸ کیلومتر) و حمل و نقل تجاری در مسیری به کوتاهی فاصله ۵۵ کیلومتر در این ناحیه، شاید دلیل پراکندگی تیلریا اوریتتالیس در گاومیش‌های بومی شهر

هوای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری ایران، برای انتشار کنه‌های سخت جنس هیالوما به‌عنوان ناقل اصلی این انگل مناسب می‌باشد (Ranjbar-Bahadori *et al.*, 2007; Tavassoli, 2006). خاطر نشان می‌گردد که گروه تیلریا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اورینتالیس می‌توانند توسط کنه‌های هیالوما، همافیزالیس و حتی ریپی سفالوس نیز منتقل شوند (Savini *et al.*, 1998).

در بررسی حاضر، بین ابتلا به تک‌یاخته با وضعیت آب و هوای شهرهای استان ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید. بنابراین به نظر می‌رسد تأثیر اقلیم در بوم‌شناسی و فیزیولوژی کنه‌ها برای چهار شهر مورد مطالعه، کمابیش یکسان باشد و احتمالاً باید علل دیگری را در تفاوت میزان آلودگی در آنها مؤثر دانست. لازم به ذکر است که معمولاً در پاتوژنز بیماری تیلریوز، ۱۳-۱۱ روز بعد از گزش، فرم پیروپلاسمی در گسترش خون دام دیده می‌شود و در این فاصله اگر از دام مذکور، نمونه خونی جهت بررسی فرم مذکور اخذ شود، نتیجه منفی خواهد بود. در صورتی که با مطالعه لئوسیت‌های داخل گردش خون در این بازه زمانی، می‌توان فرم شیزونتی را مشاهده نمود. لذا عدم مطالعه لئوسیت‌های جریانی می‌تواند نتایج منفی کاذب را به دنبال داشته باشد (Ahmad and Melhorn, 1999).

انگل‌های گروه تیلریتا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اورینتالیس در سراسر دنیا پراکنده هستند. خود تیلریا اورینتالیس در چهار ژنوتیپ دسته‌بندی شده است: ایکدا (ikedda)، چیتوز (chitose)، بافلی (buffeli) و تیپ ۴ (type 4).

تیپ ایکدا، محدود به آسیای شرقی شامل کشورهای ژاپن، کره جنوبی، بخش شمال شرقی چین و

ارومیه باشد. به عبارت دیگر احتمال می‌رود کنه‌های غیربومی آلوده، با خون‌خواری در گاومیش‌های بومی، تک‌یاخته‌ها را منتقل کرده باشند. البته این فرضیه برای اثبات، نیازمند رهیافت‌های مختلف تشخیصی در دام‌هایی است که عازم و راهی ایران می‌باشند.

فراوانی بیماری تیلریوز در میان دام‌ها به عواملی از قبیل رفتار زیرگونه‌های جغرافیایی انگل، نژاد دام، مبدأ انتقال دام، سن و وضعیت بدنی دام (بارداری، زایمان و غیره) و همچنین تغییرات ناگهانی محیط مربوط می‌شود. اضطراب زیاد و کاهش توان دستگاه ایمنی نیز می‌تواند باعث تبدیل آلودگی به بیماری بالینی گردد (Safarpour-Dehkordi *et al.*, 2012). کارشناسان تخمین می‌زنند که کنه‌ها در هر سال به میزان ده‌ها میلیارد دلار در دنیا خسارت ایجاد می‌کنند. در این میان، ابتلا به تیلریوز دهه‌هاست که باعث ضررهای زیادی در صنعت دامداری ایران می‌گردد (Hashemi-Fesharaki, 1988; Hashemi-Fesharaki *et al.*, 1998).

ناگفته نماند که زیان‌های اقتصادی ناشی از خانواده تیلریده، تاکنون در استان آذربایجان غربی تخمین زده نشده است. البته برخی کارشناسان حدس می‌زنند که در اغلب موارد در گاومیش بومی، این آلودگی انگلی به صورت تحت درمانگاهی بوده و یا حتی بدون نشانه بالینی می‌باشد. بدین ترتیب دام آلوده، تبدیل به «مخزن» انگل می‌شود که حتی در گسترش خونی آن، شکل پیروپلاسمی تک‌یاخته قابل مشاهده است. اهمیت دامی که به مخزن تک‌یاخته تبدیل می‌شود در آن است که کنه ناقل را آلوده کرده و سبب انتشار گسترده این انگل توسط آن کنه، به مدت چندین سال به دام‌های پاک می‌گردد (Ilhan *et al.*, 1998; Brown, 1990). آب و

البته گونه بسیار بیماری‌زای *تیلیریا آنولاتا* به‌خاطر فعالیت دائمی کنه‌های جنس *هیالوما* معمولاً حضور بومی دارد که این کنه‌ها، گروه *تیلیریا سرجنتی/بافلی/اوریتالیس* را هم منتقل می‌کنند (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984).

دامداران عادت دارند در فصل تابستان، توجه بیشتری به کنترل کنه‌ها داشته باشند و از دام‌های خود در فصل پاییز که مقارن با هجوم پاییزی کنه‌ها می‌باشد، غفلت می‌نمایند. ظاهراً اعتقاد دامپروران بر این است که دام‌های آنها فقط در مراتع تابستانی مورد خونخواری کنه‌های آلوده دشت‌ها قرار می‌گیرند. ولی ممکن است در اصطبل‌های پاییزی که دام‌های زیادی در مجاورت یکدیگر نگاه‌داری می‌شوند، تعدادی نیز مورد خونخواری کنه‌های آلوده قرار گیرند. البته از آنجا که گاوها و گاو میش‌های مذکور، علایم درمانگاهی بیماری را ندارند، شاید به مخزنی برای آلودگی سایر دام‌ها تبدیل شوند.

این نکته ایجاب می‌کند که برای پیشگیری از انتقال آلودگی‌ها و حفظ بهره‌وری سرمایه‌های دامی کشورهای ایران، ترکیه و عراق برای نسل‌های آینده، بخش قرنطینه دامپزشکی بیش از پیش مورد توجه سازمان‌های دولتی طرفین مرزها قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از شرکت MBST به خاطر تهیه کیت‌های آزمایشگاهی و کمک‌های فنی سپاسگزاری می‌شود.

نیز استرالیا است. البته محققان دیگری، وجود پنج تیپ از این گونه تک‌یاخته را بر اساس طبقه‌بندی پروتئین سطحی عمده فرم پیروپلاسمی آنها گزارش نموده‌اند (Yokoyama et al., 2011; Ota et al., 2009). ترکیب نوکلوتیدهای (G+C) در ژنوم *تیلیریا اوریتالیس* بیشتر از ترکیب آن در گونه‌های *تیلیریا پاروا* و *تیلیریا آنولاتا* بوده است ولی از طرف دیگر مشابه جنس *بابزیا بویس* می‌باشد. تحلیل شجره‌نامه در مورد این تک‌یاخته نشان داده است که بعد از انشعاب خانواده *تیلیریده* از خانواده *بابزیده*، دو گونه بسیار بیماری‌زا از *تیلیریا اوریتالیس* مشتق شده‌اند (Hayashida et al., 2012).

در ایران، تاکنون هیچ گزارشی از تفکیک تیپ‌های *تیلیریا اوریتالیس* ارائه نشده است. البته این مطلب به مطالعات بیشتر و وسیع‌تری نیاز دارد.

از آنجا که عامل استرس گرمایی تضعیف‌کننده دستگاه ایمنی است، بنابراین می‌تواند شدت و دوره بیماری را در مناطق گرمسیری افزایش دهد. در هر استانی از کشور که دارای اقلیم خشک و نسبتاً گرمی است، کنه‌های سخت به وفور یافته می‌شوند و این نکته، شاید الگوی انتشار *تیلیریا آنولاتا* را بتواند توجیه کند.

در این استان، اغلب دام‌های مبتلا به نوع مزمن بیماری، احتمالاً در آغاز فصل زمستان آلوده شده‌اند و در ابتدای فصل تابستان به ندرت ابتلای مزمن داشته‌اند. به نظر می‌رسد که در طول فصل پاییز، مرحله کوتاه ابتدایی آلودگی لنگاوای وقوع یافته و سپس در زمستان به مرحله مزمن خونی رسیده است.

تیلیریا اوریتالیس در هنگام نمونه‌برداری زمستانی (متعاقب اوج فعالیت پاییزی کنه‌های جنس همافیزالیس در منطقه) در شکل آلودگی مزمن وجود داشته است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Ahmad, J.S. and Melhorn, H. (1999). Review: The cellular basis of the immunity and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitological Research*, 85(7): 539-549.
- Aktas, M., Altay, K. and Dumanli, N. (2006). A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, 138(3-4): 179-185.
- Al-Saeed, A., Lokman, O., Mohammed, J. and Ahmed, J. (2010). Epidemiological studies on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Kurdistan region, Iraq. *Parasitology Research*, 106(2): 403-407.
- Arjmand-Yamchi, J. and Tavassoli, M. (2016). Survey on infection rate, vector and identification of *Theileria annulata* in cattle from Northwest, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3): 1071-1076.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S. and Gardner, M. (2004). *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by Ixodid ticks. *Parasitology*, 129 Suppl: 271-283.
- Brown, C.G.D. (1990). Control of tropical theileriosis (*T. annulata* infection) of cattle. *Parasitologia*, 32(1): 23-31.
- Hashemi-Fesharaki, R. (1988). Control of *T. annulata* in Iran. *Parasitology Today*, 4(2): 36-40.
- Hashemi-Fesharaki, R., Habibi, G.R. and Hourai, P. (1998). Delayed type hypersensitivity theilerian test in cattle vaccinated against *T. annulata* infection. *Veterinary Parasitology*, 75(2-3): 261-267.
- Hayashida, K., Hara, Y., Abe, T., Yamasaki, C., Toyoda, A., Kosuge, T., *et al.* (2012). Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation. *MBio American Society of Microbiology*, 10(1128)/mBio: 00204-00212.
- Hoghooghi-Rad, N., Ghaemi, P., Shayan, P., Eckert, B. and Sadr-Shirazi, N. (2011). Detection of native carrier cattle infected with *Theileria annulata* by Semi-nested PCR and smear method in Golestan province of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 12(3): 317-323.
- Hoseini, S.H., Haddadzadeh, H., Meshgi, B., Nabian, S. and Razavi, M. (2003). Domestic animals parasitic infections. Iran: Tehran, Tehran University Press, pp: 41-57. [In Persian]
- Ilhan, T., Williamson, S., Kirvar, E., Shields, B. and Brown, C.G. (1998). *T. annulata*: Carrier state and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 29(849): 109-125.
- Ota, N., Mizuno, D., Kuboki, N., Igarashi, I., Nakamura, Y., Yamashina, H., *et al.* (2009). Epidemiological survey of *T. orientalis* in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7): 937-944.
- Ranjbar-Bahadori, Sh., Eslami, A. and Aghaebrahimi-Samani, R. (2007). A survey on parasitic infestation of native ruminants of Golestan Province. *Journal of Veterinary Research*, 62(5): 303-305.
- Safarpour-Dehkordi, F., Parsaei, P., Saberian, S., Moshkelani, S., Hajshafiei, P., Hoseini, S.R., *et al.* (2012). Prevalence study of *T. annulata* by comparison of four diagnostic techniques in Southwest Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 15(2): 123-130.
- Salim, B., Bakheit, M.A., Kamau, J., Nakamura, I. and Sugimoto, C. (2010). Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *T. equi* from horses in Sudan. *Parasitology Research*, 106(2): 493-498.

- Savini, G., Onuma, M., Scaramozzino, P., Kakuda, T., Semproni, G. and Langella, V. (1998). First report of *T. sergenti* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in Italy. Annual New York Academy Science, 849: 404-407.
- Shah Hoseini, M.H. and Seyed Reza Tehrani, S.M. (2001). Polymerase chain reaction. Iran: Tehran, Parsian Press, pp: 127-159. [In Persian]
- Shayan, P. and Rahbari, S. (2005). Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. Parasitology Research, 62(2): 15-20.
- Shaw, M.K. (2002). *Theileria* development and host cell invasion. In: World Class Parasites, 3, *Theileria*. Dobbelaere, D.A.E. and Mc Keever, D.J. editors. UK: London, Kluwer, Boston, pp: 1-22.
- Striepen, B., Jordan, C.N., Reiff, S. and van Dooren, G.G. (2007). Building the perfect parasite: Cell division in Apicomplexa. PLOS Pathogens, 3: 691-698.
- Tavassoli, M. (2006). Veterinary Protozoology. 1st ed., Iran: Urmia, Jahad Daneshgahi Press, pp: 186-200. [In Persian]
- Thrusfield, M. (2005). Veterinary Epidemiology. 3rd ed., UK: Oxford, Blackwell Publishing, pp: 232-234.
- Uilenberg, G. and Hashemi-Fesharaki, R. (1984). *T. orientalis* in Iran. Veterinary Quarterly, 6(1): 1-4.
- Yokoyama, N., Ueno, A., Mizuno, D., Kuboki, N., Khukhuu, A., Igarashi, I., *et al.* (2011). Genotypic diversity of *Theileria orientalis* detected from cattle grazing in Kumamoto and Okinawa prefectures of Japan. Journal of Veterinary Medical Sciences, 73(3): 305-312.