

# بررسی سرم شناسی عفونت ناشی از تیلیریا آنولاتا در گاو به روش الیزا و مقایسه آن با مشاهدات بالینی و ریزینی

دکتر احمد مرشدی<sup>۱\*</sup> دکتر محمدرضا حریدالهی<sup>۲</sup> دکتر موسی توسلی<sup>۱</sup> دکتر بهرام دلیرنقده

دریافت مقاله: ۱۴ بهمن ماه ۱۳۸۱  
پذیرش نهایی: ۱۲ شهریور ماه ۱۳۸۲

## A seroprevalence survey of Theileria infection by ELISA, compare with blood-smear observation in cattle.

Morshedi, A.,<sup>1</sup> Horr-yadollahi, M.R.,<sup>2</sup> Tavassoli, M.,<sup>1</sup> Dalir-Naghade, B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran. <sup>2</sup>Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.

**Objective:** Evaluation of an ELISA test using the cellular schizont antigen for the diagnosis of *Theileria anulata* infection.

**Design:** Descriptive study.

**Animals:** A total of 124 cattle, 56 cases with clinical features and 68 samples without clinical features and apparently healthy.

**Procedure:** Serum was collected from cattle for the detection of anti-Theileria antibodies by indirect ELISA, using the cellular schizont antigen and the microplates coated with this antigen. On the blood-smears from the same cases, microscopic observation was done for determine the percentage of positive and negative cases of Theileria infection.

**Statistical analysis:** Descriptive statistics.

**Results:** Out of 56 serum samples, belong to animals with clinical features, 42 cases (75%) were ELISA-Positive and the rest (25%) were ELISA-negative whereas, all of them had positive blood-smears. Also, out of 68 serum from apparently healthy animals, 19 cases (27.9%) were ELISA-positive and 15 cases (22%) were blood smear-positive.

**Conclusion:** The present study by using of cellular schizont as solid phase antigen, showed high quality for detection of anti-Theileria antibodies by ELISA, and this test could detect 54 cases (76%) from a total of 71 animals with Theileria-positive blood-smears. The results showed good correlation (80% coincidence) between the data obtained by two methods. Therefore, the ELISA could be recommended as a screening test for detecting of Theileria infection in cattle. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4:319-322, 2003.*

**Key words:** *Theileria anulata*, Indirect ELISA, Cattle.

**Corresponding author email:** Ahmad\_Morshedi@yahoo.com

در بدن ساخته می شود (۴). همچنین در مطالعه دیگری Anju Manuja و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از آزمون ایمونوپراکسیداز نشان دادند که دو آنتی بادی منوکلونال Eu-1 و Eu-106 می توانند با آنتی ژنهای سطحی شیزونت تیلیریا آنولاتا واکنش نمایند. در یک بررسی با آزمون ایمونوبلاتینگ یک پروتئین ایمونودامیننت پلی مرفیک در پرده پلاسمایی لنفوبلاست های آلوده به تیلیریا آنولاتا و تیلیریا پاروا به وسیله آزمون الیزا نشان داده شد (۱۲). در بررسی دیگری توسط Schnittger و همکاران در سال ۲۰۰۲ بین پروتئین ایمونودامیننت سطح شیزونت سلولی تیلیریا آنولاتا و تیلیریا پاروا ۹۳ درصد تشابه به دست آمد که در آزمونهای سرم شناسی، قابل استفاده تشخیص داده شد. اخیراً تست الیزای غیرمستقیم را برای جستجوی آنتی بادی تیلیریا پس از واکسینه کردن گاووان به کار گرفته اند (۱۴). هدف از تحقیق حاضر استفاده از آنتی ژن شیزونت سلولی در بررسی

هدف: استفاده از آنتی ژن شیزونت سلولی تیلیریا در آزمون الیزای غیرمستقیم و تعیین ارزش الیزا در بررسی سرم شناسی میزان آلودگی گاوها به تیلیریا است. طرح: مطالعه توصیفی.

حیوانات: صد و بیست و چهار رأس گاو و گوساله، که پنجاه و شش رأس با علائم درمانگاهی و شصت و هشت رأس بدون علائم بالینی و به ظاهر سالم بودند. روش: خونگیری از گاوها و جدا نمودن سرم و تهیه گسترش خونی و جستجوی پادتن ضد تیلیریا در سرم به روش الیزای غیرمستقیم با تعیین OD نمونه ها و درصد موارد الیزا مثبت و الیزا منفی و مقایسه نتایج به دست آمده از الیزا و گسترش خونی در دو گروه با علائم و بدون علائم بالینی. تعیین حساسیت و ویژگی الیزای تیلیریا و نیز تعیین درصد موافقت بین دو آزمون الیزا و گسترش خونی.

تجزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی.

نتایج: از مجموع ۱۲۴ نمونه سرم، ۵۶ نمونه مربوط به موارد با علائم بالینی و لام مثبت خونی بود که ۴۲ مورد آن (۷۵ درصد) الیزا مثبت و ۱۴ مورد (۲۵ درصد) الیزا منفی به دست آمد که ظاهراً منفی کاذب به حساب آمدند. از بین ۶۸ نمونه مربوط به گاوهای فاقد علائم بالینی، ۱۵ مورد (۲۲ درصد) دارای گسترش خونی مثبت و ۱۹ مورد (۲۷/۹ درصد) تست الیزا مثبت داشتند. همچنین از ۱۲۴ گسترش خونی، ۷۱ مورد تیلیریا مثبت بودند که ۵۴ مورد (۷۶ درصد) در الیزا نیز مثبت شدند و از ۵۳ لام خونی منفی، ۷ مورد (۱۳/۲۰ درصد) الیزا مثبت به دست آمد که ظاهراً الیزا مثبت کاذب به حساب آمدند.

نتیجه گیری: در تحقیق حاضر نشان داده شد که استفاده از شیزونت سلولی به عنوان آنتی ژن فاز جامد در الیزا حساسیت بالایی در اندازه گیری پادتن دارد و آزمون الیزا توانست ۶۱ مورد (۴۹/۱ درصد) آلودگی به تیلیریا را کشف نماید. با توجه به داده های به دست آمده از الیزا و گسترش خونی، حساسیت الیزای تیلیریا ۷۶ درصد و ویژگی آن ۸۶/۸ درصد و موافقت بین دو روش ۸۰ درصد به دست آمد. از اینرو از آزمون الیزای غیرمستقیم می توان به عنوان یک آزمون غربالی در تعیین میزان آلودگی گاوها به تیلیریا استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۱۹-۳۲۲.

واژه های کلیدی: الیزای تیلیریا، تیلریوز گاو، تیلیریا آنولاتا.

تیلریوز، بیماری تک یاخته ای خطرناک نشخوارکنندگان اهلی بویژه گاو می باشد. عامل اصلی این بیماری در ایران تیلیریا آنولاتا، تک یاخته قابل انتقال به وسیله کنه است (۳). در مناطق بومی اکثر گاوهای بالغ و گوساله ها آلوده می باشند و از نظر اقتصادی یک مشکل مهم در اجرای برنامه های اصلاح نژاد در خاورمیانه و آسیا می باشد و حدود ۲۰۰ میلیون گاو در خطر ابتلاء قرار دارند. خسارات دیگر این بیماری زردی، لاغری و مرگ است (۱۱). توسلی و همکاران در سال ۱۳۷۹ در بررسی روی گاوهای کشتاری در ارومیه، میزان آلودگی به تیلیریا را با روش گسترش خونی، ۲۶ درصد به دست آوردند. آنتی بادیهای ضد تیلیریا بر ضد اسپوروزویت، شیزونت و پیروپلاسم انگل

(۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

(۲) دانش آموزنده دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

(\*) نویسنده مسؤول Ahmad\_Morshedi@yahoo.com



جدول ۱- نتایج به دست آمده از الایزا و مشاهدات گسترش خونی در ۱۲۴ گاو و گوساله با علایم تیلریوز و به ظاهر سالم.

تعداد نمونه	میانگین OD	نتیجه الایزا +/-	نتیجه مشاهده ریزبینی +/-	علایم بالینی تیلریوز +/-
۱۲	۱/۵۳۷	+	+	-
۷	۱/۴۱۸	+(مثبت کاذب)	-	-
۳	۰/۷۹۱	-(منفی کاذب)	+	-
۴۶	۰/۷۵۹	-	-	-
۴۲	۱/۷۶۳	+	+	+
۱۴	۰/۹۲۴	-(منفی کاذب)	+	+

گردید، سپس با استفاده از محلول فایکول - هایپک و سانتیفریوژ اقدام به جداسازی شیزونت شد. به این ترتیب که ۱۰ میلی لیتر واکسن در دو لوله ریخته و به هر لوله ۵ میلی لیتر (نصف حجم واکسن) محلول فایکول - هایپک به آرامی و از جدار لوله روی واکسن اضافه شد و لوله ها به مدت ۲۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتیفریوژ گردید. پس از سانتیفریوژ ۳ فاز متمایز در لوله ها تشکیل شد، به طوری که رسوب پایین لوله حاوی شیزونت و فاز وسط محلول فایکول هایپک و روی آن لایه لنفوسیتی قرار داشت. با دور ریختن محلول رویی و شستن رسوب با PBS (دوبار) جهت حذف فایکول هایپک، رسوب بار آخر به منظور تراکم بیشتر شیزونت در نصف حجم برداشت شده از واکسن (۵ میلی لیتر بافر در هر لوله) در بافر کربنات - بی کربنات حل گردید. میزان تراکم شیزونت با ریختن ۲۰ میکرولیتر از تعلیق آن روی دایره ای برابر قطر حفره پلیت، در روی یک لام و رنگ آمیزی آن، امتحان گردید و تراکم تنگاتنگ شیزونت ها مشاهده گردید. از همین تراکم شیزونت و با یک حجم ۵ برابر (۱۰۰ میکرولیتر) از مایع شیزونت به هر یک از حفرات پلیت ریخته شد (۵).

**آماده نمودن پلیت ها:** نظر به این که پلیت تجارته پوششدار با آنتی ژن تیلریا در دسترس نبود، میکروپلیت ته صاف بر اساس روش (۵، ۱۶) با شیزونت سلولی تیلریا پوشش دار گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ژن به هر حفره ریخته شد و پس از یکساعت انکوبه در ۳۷ درجه و یک شب در یخچال، جهت فیکسه شدن شیزونت در پلیت به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین حاوی ۰/۲۵ درصد گلو تار آلدیید اضافه و بعد از ۳ دقیقه، ۳ بار شستشو گردید. جهت مسدود کردن فضای بین شیزونت ها به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلبومین گاوی ۱ درصد در بافر فسفات سالین افزوده و یک شب در ۴ درجه گذاشته و سپس ۳ بار شستشو گردید. پرشدن فضای بین شیزونت ها به وسیله آلبومین مانع از چسبیدن آنتی بادیهای غیراختصاصی به پلیت شده و از واکنش های کاذب جلوگیری می کنند (۸).

**آزمون الایزا:** نمونه های سرمی و سرم شاهد منفی و مثبت به نسبت ۱:۱۰۰ در بافر رقیق کننده سرم رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر به هر حفره و به صورت Duplicate از هر سرم به هر حفره میکروپلیت ریخته و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از ۳ بار شستن ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه پراکسیداز به هر حفره ریخته و مجدداً یکساعت در ۳۷ درجه انکوبه و پس از ۳ بار شستن، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر حفره ریخته و ۱۰ دقیقه دور از نور گذاشته شد و به محض مشاهده رنگ آبی ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر حفره اضافه گردید و OD حفرات به وسیله دستگاه فتومتر (Well Scan) در ۴۵۰ نانومتر خوانده و ثبت گردید (۹).

ملاک مثبت شدن: در مورد OD انتخاب شده به عنوان ملاک الایزا مثبت یا منفی گرفتن نمونه ها بر حسب مطالعات دیگران روی الایزی تیلریا

سرم شناسی گاوهای با علایم بالینی، لام خونی مثبت و گاوهای به ظاهر سالم با آزمون الایزی غیرمستقیم و تعیین ارزش الایزا در بررسی میزان آلودگی گاوها به تیلریا است.

### مواد و روش کار

- تهیه گسترش خونی و خونگیری از ۱۲۴ گاو و گوساله و تهیه سرم جهت آزمون الایزا. سرمها تا هنگام آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.
- آنتی ژن: از واکسن تیلریوز گاوی، حاوی لنفوبلاست های آلوده به شیزونت تیلریا و شیزونت آزاد، ساخت مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی استفاده گردید. از این واکسن شیزونت نسبتاً خالص تهیه و به عنوان آنتی ژن به کار رفت.
- سایر معرفهای الایزا، شامل: بافر رقیق کننده سرم، بافر شوینده پلیت، کنژوگه پراکسیداز آنتی IgG گاوی، محلول سوبسترا، محلول متوقف کننده، سرم شاهد منفی، ساخت شرکت (Svanova, Biothec, Sweden)، سرم شاهد مثبت (مؤسسه رازی حصارک).
- ۱۵ نمونه سرم از گاوان با گسترش خون منفی از نظر تیلریا، که ۲۵ روز قبل از خونگیری یک دوز واکسن تیلریا به هر گاو تزریق شده بود، به منظور اندازه گیری پادتن ضد تیلریا/نولتا در گاوان واکسینه، آماده شد.
- بافر پوشش دهنده پلیت (Coating Buffer)، شامل بافر کربنات بی کربنات با pH برابر ۸/۶.
- آلبومین ۱ درصد در بافر PBS جهت پر کردن فضاهای بین شیزونت در پلیت و گلو تار آلدیید ۰/۲۵ درصد در بافر PBS جهت فیکسه کردن شیزونت ها در میکروپلیت.
- محلول فایکول - هایپک با وزن مخصوص ۱/۰۸۰ (ساخت لابر اتوار بهار - تهران) جهت جداسازی لاشه لنفوبلاست ها از واکسن تیلریا و تهیه شیزونت سلولی.

### روش کار

**نوع حیوان:** نمونه برداری در این مطالعه از گاوان دورگ و بومی منطقه ارومیه به صورت تصادفی انجام گرفت. از نظر سن و جنس، گروه سنی و جنس مدنظر نبود و گاوان در همه سنین و گوساله های بالای شش ماه مورد نمونه برداری قرار گرفتند و نتایج به دست آمده نیز از نظر گروه های سنی و جنس مورد تجزیه و تحلیل قرار نگرفتند. از نظر فصل نمونه برداری از اواخر فروردین آغاز و تا نیمه دوم مهر ماه ادامه یافت.

**نمونه برداری:** در ۶ ماهه اول ۱۳۸۰ از ۱۲۴ گاو و گوساله نمونه سرم و گسترش خونی تهیه گردید، گسترشها پس از رنگ آمیزی با گیمسا مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفتند. از ۱۲۴ گاو، تعداد ۵۶ رأس دارای علایم بالینی تیلریوز و بقیه دامها به ظاهر سالم بودند. خونگیری از دامهای به ظاهر سالم به طور تصادفی و به روش خوشه ای انجام شد. از ۱۵ دام با علایم بالینی تیلریوز علاوه بر گسترش خونی از غده لنفوی پیش کتفی نیز گسترش ریزبینی و پس از رنگ آمیزی با گیمسا از نظر وجود شیزونت مورد آزمایش قرار گرفتند. وجود شیزونت در تمام ۱۵ نمونه در میدان ریزبینی تأیید شد. ضمناً از دامهای بدون علایم دوبار با فاصله گسترش خونی پهن و ضخیم تهیه شد، به جز در مواردی که دسترسی مجدد به دام امکانپذیر نبود.

تهیه آنتی ژن از واکسن تیلریا: ابتدا جهت آزاد شدن شیزونت از لنفوبلاست ها، با پنج بار انجامد و ذوب، اقدام به پاره کردن لنفوبلاست ها

جدول ۲ - مقایسه نتایج الایزا با گسترش خونی در گاوهای با نشانه بالینی تیلریوز و دامهای به ظاهر سالم.

دامهای به ظاهر سالم			جمع (فراوانی نسبی)	دامهای با علائم بالینی		
جمع (فراوانی نسبی)	الایزای منفی (فراوانی نسبی)	الایزای مثبت (فراوانی نسبی)		الایزای منفی (فراوانی نسبی)	الایزای مثبت (فراوانی نسبی)	
۱۵ (۲۲٪)	۳ (۲۰٪)	۱۲ (۸۰٪)	۵۶ (۱۰۰٪)	۱۴ (۲۵٪)	۴۲ (۷۵٪)	لام خونی مثبت
۵۳ (۷۸٪)	۴۶ (۸۶/۱۸)	۷ (۱۳/۱۲)	۰ (۰٪)	۰	۰	لام خونی منفی
۶۸ (۱۰۰٪)	۴۹ (۷۲٪)	۱۹ (۲۷/۹)	۵۶ (۱۰۰٪)	۱۴ (۲۵٪)	۴۲ (۷۵٪)	جمع

به دست آمد. در مقایسه ای بین آنتی ژنهای شیزونت محلول و شیزونت سلولی و پیروپلاسمی محلول برای جستجوی آنتی بادی تیلریا/نولوتا با الایزا، نشان داده شد که آنتی ژن پیروپلاسم و شیزونت سلولی می توانند در جستجوی آنتی بادیها به طور موفقیت آمیزی در سرم گاو به کار گرفته شوند (۵). در تحقیق حاضر نیز از شیزونت سلولی به عنوان آنتی ژن در تست الایزا استفاده شد که حساسیت بالایی در اندازه گیری پادتن در سرم نشان داد.

در مطالعه ای که در تامیل هندوستان با روش الایزا و گسترش خونی روی ۲۵۰ نمونه سرم گاو و گاو میش انجام شد، ۶۴/۴ درصد گاوها و ۴۱/۹ درصد گاو میشها تست الایزا مثبت داشتند و حال آنکه ۲۲/۸ درصد گاوها و ۸ درصد گاو میشها پارازیتمی را نشان دادند (۱۵). در مطالعه حاضر از ۶۸ گاو به ظاهر سالم و فاقد علائم درمانگاهی ۲۲ درصد گاوها لام خونی مثبت نشان دادند و حال آن که ۲۷/۹ درصد آنها تست الایزای مثبت داشتند. این ۵/۹ درصد تفاوت ظاهراً الایزا مثبت کاذب به حساب آمد. لکن می تواند ناشی از تماس قبلی دام با تیلریا و ایجاد یک شکل تحت بالینی زودگذر با بهبود خود به خودی نیز باشد. همچنین از ۵۶ سرم مربوط به گاوهای با علائم درمانگاهی و لام خونی مثبت ۷۵ درصد الایزا مثبت و ۲۵ درصد الایزا منفی به دست آمد که ظاهراً منفی کاذب به حساب آمدند. لکن این احتمال وجود دارد که تعدادی از نمونه های الایزا منفی کاذب مربوط به مواردی از بیماری درمانگاهی باشد که دوره کمون کوتاهتر از ۷ روز داشته و هنوز تیترا آنتی بادی به حدی نرسیده بوده که در الایزا مثبت گردند.

در یک بررسی در شرق ترکیه روی ۱۱۰ گاو با تستهای IFA، PCR و گسترش خونی، نشان داده شد که آزمون PCR ۳۰ درصد، IFA ۲۹/۸ درصد و گسترش خونی ۱۶/۱ درصد نتیجه مثبت داشتند. گرچه در مقایسه PCR با لام خونی، PCR موارد منفی کاذب نشان نداد، ولی حدود ۱۴ درصد موارد PCR مثبت فاقد لام خونی مثبت بودند که ظاهراً مثبت کاذب به حساب می آیند. لکن همان طور که بحث گردیده موارد PCR مثبت با لام خونی منفی می تواند به علت آلودگی قبلی حیوان و ایجاد شکل تحت بالینی زودگذر باشد (۷). در تحقیق حاضر با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و گسترش خونی، ۱۷ نمونه الایزا منفی کاذب نشان داده شد (جدول ۲). از این رو حساسیت الایزا ۷۶ درصد به دست آمد. از سوی دیگر ۷ مورد الایزا مثبت کاذب در بین حیوانات فاقد علائم بالینی و لام خونی منفی مشاهده گردید (جدول ۲). از این رو ویژگی الایزای تیلریا ۸۶/۸ درصد به دست آمد. همچنین داده های به دست آمده از دو آزمون گسترش خونی و الایزا همخوانی بین نتایج دو آزمون را ۸۰ درصد (۱۰۰/۱۲۴) نشان داد. مطالعات روی اندازه گیری پادتنهای ضد تیلریا با روش الایزا از وسعت کمی برخوردار بوده و مقالات موجود نسبتاً کم است. هدف این مطالعه آن بود که نشان دهیم آیا اصولاً آنتی بادی قابل اندازه گیری با الایزا در سرم دامهای آلوده و

از نسبت T/N استفاده شده که عبارت است از OD سرم تست تقسیم بر OD سرم کنترل منفی (OD of test serum / OD of Negative serum). کلیه سرمهای تست که نسبت T/N آنها مساوی یا بزرگتر از ۲ بود مثبت در نظر گرفته شد (۹). به طوری که ۱۵ مورد سرم گاو که به آنها واکسن تیلریا تزریق شده بود نسبت T/N در همگی آنها مساوی یا بزرگتر از ۲ به دست آمد.

### نتایج

از ۱۲۴ نمونه سرم مورد آزمایش، ۶۱ مورد (۴۹/۱ درصد) تست سرمی الایزا مثبت داشتند و بقیه الایزای منفی بودند. ملاک مثبت شدن در آزمون الایزا به این ترتیب بود که OD سرمهای با بیش از ۲ برابر OD سرم شاهد منفی، الایزا مثبت در نظر گرفته شد. بالاترین میانگین OD سرمهای الایزا مثبت ۱/۷۶۳ و پایین ترین میانگین آنها ۱/۴۱۸ به دست آمد (جدول ۱). میانگین OD سرم شاهد منفی ۰/۱۶۳ به دست آمد. از مجموع ۱۲۴ نمونه سرم، ۶۸ نمونه آن مربوط به گاوان فاقد علائم بالینی بود که ۱۵ مورد آن (۲۲ درصد) در مشاهده ریزیینی از نظر پیروپلاسم تیلریا مثبت بودند و نیز ۱۹ مورد (۲۷/۹ درصد) تست الایزا مثبت نشان دادند. ۵۶ نمونه دیگر از سرمها از گاوان با علائم بالینی تیلریوز و لام خونی مثبت به دست آمده بودند که ۴۲ مورد آن (۷۵ درصد) الایزا مثبت و ۱۴ مورد (۲۵ درصد) الایزا منفی بودند که ظاهراً منفی کاذب به حساب می آیند (جدول ۱ و ۲). از مجموع ۱۲۴ لام خونی، ۷۱ نمونه از نظر ریزیینی تیلریا مثبت بودند که ۵۴ مورد آن (۷۶ درصد) در تست الایزا نیز مثبت بودند. از طرف دیگر از ۵۳ نمونه لام خونی تیلریا منفی فقط ۷ نمونه (۱۳/۲۰ درصد) الایزا مثبت بودند که ظاهراً مثبت کاذب به حساب می آیند (جدول ۲).

### بحث

در مطالعه ای در ارومیه نشان داده شد که بیماری تیلریوز تظاهر فصلی داشته و از فروردین ماه شروع و در طول ماههای خرداد و تیر به فراوانی آن افزوده شده و در ماههای مرداد و شهریور از تعداد مبتلایان کاسته شده به طوری که در ماههای مهر و آبان تعداد مبتلایان بسیار کم و در نیمه دوم آبان به صفر می رسد (۲). از این رو در مطالعه حاضر نمونه برداری از اواخر فروردین شروع و تا نیمه اول مهرماه ادامه یافت.

Gupta و همکاران در سال ۱۹۹۸ یکماه پس از واکسینه کردن ۱۲۶ گوساله با واکسن کشت نسجی تیترا آنتی بادی را به روش الایزا از ۱:۱۲۸۰ تا ۱:۴۰۹۶۰ به دست آوردند. در یک بررسی توسط Singh و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که ۷۸/۳ درصد از گاوهای غیرواکسینه در فصل شیوع بیماری الایزا مثبت بودند و ۹۷/۵ درصد از حیوانات واکسینه یک ماه پس از واکسینه شدن افزایش عیار آنتی بادی را بوسیله الایزا نشان دادند. میانگین عیار آنتی بادی در دامهای واکسینه بیش از دامهای غیرواکسینه



## References

۱. توسلی، م.، تاجیک، ح. و نجفیان بالا، ع. (۱۳۸۰): بررسی کشتارگاهی آلودگی به تک یاخته های خونی در گاو در ارومیه. نشریه خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران، چاپ اول، صفحه: ۷۲.
۲. شیرازی، ج. (۱۳۷۱): بررسی موارد بالینی تیلبیوز در نشخوارکنندگان در ارومیه، پایان نامه شماره ۲۴۲، دانشکده دامپزشکی ارومیه، صفحه: ۲۸-۲۳.
۳. هاشمی فشارکی، ر. (۱۳۶۵): تیلبیوز گاوی در ایران، نشریه مؤسسه رازی حصارک سازمان تحقیقات کشاورزی، چاپ اول، صفحه: ۱۰-۵.
4. Anju, M., Nichani, A. K., Kumar, R., Raka, N. D. and Sharma, R. D. (2000): Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detecting antibodies against *Theileria anulata*. Vet. Parasitol. 80: 93-101.
5. Anju, M., Rakesh, K., Nichani, A. K., Sharma, R.D. and Kumar, B. (2001): Assays for studies on *Theileria anulata* using monoclonal Antibodies, Indian J. Vet. Res. 10, 1: 21-27.
6. Anju, M., Nichani, A. K.; Kumar, R. Sharma, R.D. and Kumar, B. (2001): Single dilution ELISAS using soluble piroplasm, cellular schizont and soluble schizont antigens for the detecting of antibodies against *Theileria anulata*. Vet. Res. 32, 2: 165-173.
7. Aktas, M., Dumanli, N., Cetinkaya, B. and Cakmak, A. (2002): Field evaluation of PCR in detecting *Theileria anulata* infection in cattle in eastern Turkey. Vet. Rec. 150, 17: 548-549.
8. Caponi, L. and Migliorini, P. (1999): Antibody usage in the Lab. Springer, Lab. manual, London. PP: 34-50.
9. Gray, M.A., Lukins, A.G., Rae, R.F. and Brown, C.G. D. (1980): Evaluation of ELISA for serodiagnosis of infection with *Theileria anulata*, Res. Vet. Sci. 29: 360-366.
10. Gupta, S.A., Shatma, R.D., Rako, N.A. and Nichani, A. K. (1998): Immune response to *Theileria anulata* cell culture vaccine under field condition in bovines. Vet. Parasitol. 21, 2: 137-143.
11. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliffe, K.W. (2000): Vet. Med. 9<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Co, London. PP: 1328-1329.
12. Sen Gupta, P., Bansal, G. and Ray, D. (1997): Immunodominant protein on plasma membrane of bovine lymphoblasts infected with *Theileria anulata*, Indian Vet. J. 67, 3: 205-206.
13. Schnittger, L., Katzer, F., Biermann, R., Shayan, P., Bogushawski, K., McKellar, S., Beyer, D., Shiels, B.R., Ahmed, J.B. (2002): Characterization of a polymorphic *Theileria anulata* surface protein, closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. Mol. Biochem. parasitol. 120, 2: 247-256.
- یا دامهای واکسن گرفته وجود دارد یا نه و دیگر اینکه نسبت T/N در مورد ODهای به دست آمده از گاوان واکسینه و یا آلوده با لام خونی مثبت در مقایسه با OD سرم کنترل منفی می تواند با ارزش باشد یا خیر. نظر به اینکه در تمامی تست های سرمی الایزا در بیماری های عفونی مختلف نسبت T/N ۲ یا ۲/۵ برابر و بالاتر الایزا مثبت در نظر می گیرند و در مورد الایزای تیلبیوز نیز همین نسبت صادق بود، از این روش الایزا می تواند در تعیین میزان دامهای سروپوزتیو در گله و نیز اندازه گیری پادتن ضد تیلبیوز در گاوان واکسینه و طول دوام پادتن در سرم مورد استفاده قرار گیرد.
- نتایج کلی این مطالعه نشان داد که با توجه به حساسیت و ویژگی خوب و وجود ۸۰ درصد سازگاری بین آزمون الایزا و گسترش خونی و نیز سهولت انجام الایزا در حجم های زیاد نمونه، می توان از الایزا به عنوان یک آزمون غربالی استفاده نمود.
14. Singh, S., Karti, N.K., Manuja, A., Sharma, R.D. and Nichani, A.K. (2001): Impact of field vaccination with a *Theileria anulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis. Vet. Parasitol. 101: 91-100.
15. Soundarajan, C., Rajavellu, G. and Anandan, R. (2000): Enzymed-linked Immunosorbant assay for the detection of *Theileria anulata* infection in cattle and buffaloes. J. Vet. Parasitol. 14: 165-166.
16. Suri, D., Rakha, N. and Nickani, A.K. (1996): Comparative studies on ELISA and IFA test for assesment of humoral responses in bovine tropical theileriosis. Indian J. comp. Microbiol. Immunol. Diseases. 17: 1552-1560.