

# گزارش آلودگی توأم یک رأس گاو نژاد هولشتاین با تیلریا آنولاتا و بابزیا

## باژمینا در یکی از گاوداری‌های سنتی شهرستان تبریز

امیررضا جوادی‌مقانی<sup>۱</sup>، عباس شهبازی<sup>۲</sup>، اسماعیل فلاح<sup>۳\*</sup>، مجید خان‌محمدی<sup>۳</sup>، احمد نعمت‌اللهی<sup>۴</sup>، جواد اشرفی‌هلان<sup>۵</sup>،  
مجید فرتاش‌وند<sup>۵</sup>، محمود محامی‌اسکوئی<sup>۱</sup>

### چکیده

آلودگی بابزیا باژمینا و تیلریا آنولاتا بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ایران شایع می‌باشد. آلودگی توأم گاوها به تیلریا آنولاتا و آناپلازما مارزیناله از کرمان گزارش شده اما گزارشی از آلودگی همزمان گاو به تیلریا آنولاتا و بابزیا باژمینا منتشر نشده است. گزارش حاضر بر آلودگی یک رأس گاو از نژاد هولشتاین، در یکی از گاوداریهای بومی شهرستان تبریز، به انگل‌های خونی از جنس تیلریا و بابزیا دلالت دارد. علائم بالینی شامل تورم غدد لنفاوی سطحی، تب (۴۰-۴۱ درجه سانتی‌گراد)، بی‌اشتهایی، افزایش ناحیه شنیده شدن صدای قلب، تکیکاردی، کم‌خونی شدید، هموگلوبینوری و لاغری بود. گسترش‌های خونی متعدد از ورید گوش حیوان مبتلا تهیه و با گیمسا رنگ آمیزی گردید. پس از بررسی و ثبت خصوصیات مورفولوژیک انگل در زیر میکروسکوپ نوری و مقایسه آن با لامهای آرشیو شده در بخش انگل‌شناسی و نتایج حاصل از روش PCR، آلودگی توأم به تیلریا آنولاتا و بابزیا باژمینا مورد تأیید قرار گرفت. واژگان کلیدی: تیلریا آنولاتا، بابزیا باژمینا، آلودگی توأم، گاو، تبریز

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۶

### مقدمه

انگل‌های تک یاخته‌ای پروپلازما (بابزیا و تیلریا) از عوامل بیماریزای مهم حیوانات اهلی و وحشی می‌باشند. این ارگانسیم‌ها بدلیل ایجاد بیماری و مرگ و میر شدید در حیوانات اهلی و اهمیت انتقال برخی از جنس و گونه‌های آنها به انسان، سبب ایجاد خسارات اقتصادی و بهداشتی فراوان در سراسر جهان می‌گردند (۷ و ۵). در کشور ما ایران نیز این بیماری‌ها در بین حیوانات اهلی اهمیت بسیار زیادی

از لحاظ خسارات اقتصادی دارد و حتی بدلیل وجود میزبانهای ناقل آن احتمال انتقال بعضی از جنس و گونه‌های آن به انسان نیز محتمل است. بیماری‌های ناشی از تیلریا و بابزیا هر سال در مناطق مختلف کشورمان در طی فصول بهار و تابستان (با شروع فصل فعالیت کهنه)، حتی در اوایل پاییز در حیوانات اهلی شیوع پیدا می‌کند (۸ و ۱). این تک یاخته‌ها توسط کهنه‌های خانواده ایکسودیده (کهنه‌های سخت) به حیوان وانسان منتقل می‌شود (۸ و ۲). بیماری بابزیوزیس و تیلریوزیس در ایران، طبق گزارشات موجود، در بین گوسفندان به مراتب بیشتر از گاوان بوده و این اختلاف را می‌توان به وضع گاوداری‌ها و گوسفند داری‌های موجود در سراسر سطح کشور مربوط دانست (۱). وجود آلودگی به این تک یاخته را در گاوان و خسارات اقتصادی و بهداشتی آن در سطح کشورمان و بعلاوه احتمال انتقال برخی از جنس و گونه‌های این گروه از تک یاخته‌ها به انسان (همانند بابزیا بویس) نباید بی‌اهمیت تلقی گردد. علائم بالینی مشکوک به تیلریوزیس و بابزیوزیس در گاوداری‌های برخی از استان‌های کشورمان دیده شده که این موارد یا در گاوداری‌های آن منطقه قبلاً وجود نداشته و یا خیلی نادر بوده است که اخیراً به طرز چشمگیری افزایش یافته است. علائم بالینی تیلریوزیس در گاو عمدتاً شامل تورم غدد لنفاوی، افزایش درجه حرارت بدن (۳۹/۵ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد، خونریزی‌های پتشی و اکیموز در مخاط، ایکتر، کم‌رنگی

\* گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران fallahe@tbzmed.ac.ir

۲- گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند، ایران

۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

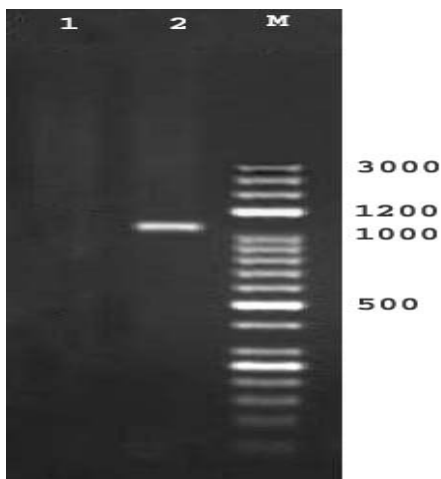
۵- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

ملتحمه، بی‌اشتهایی و حتی قطع نشخوار و علائم بالینی بابزیوس در گاو عمدتاً شامل تب (گاه تا ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد)، بی‌اشتهایی، افزایش تعداد تنفس، افزایش ضربان قلب، هموگلوبینوری (بابزیا باژمینا) و درگیری سیستم اعصاب مرکزی (بابزیا بوویس) است (۴ و ۲، ۱)

### تاریخچه بیماری

طی گزارشی از یکی از گاوداری‌های سستی اطراف شهرستان تبریز، در یک راس گاو هلشتاین ماده با سن حدود ۵ سال، علائمی از قبیل تورم غدد لنفاوی سطحی، افزایش درجه حرارت بدن (حدود ۴۱-۴۰ درجه سانتی‌گراد)، بی‌اشتهایی، افزایش شدید تعداد ضربان قلب، افزایش وسعت ناحیه شنیده شدن صدای قلبی به طوری که صدای قلب و ضربان نبض در پهلوئی چپ (پشت دنده ۱۳) قابل شنیدن بود، کم‌خونی شدید، رنگ پریدگی مخاطات و هموگلوبینوری مشاهده شد. پس از حضور در بالین دام و مشاهده علائم بالینی، اقدام به تهیه گسترش خونی از ورید گوش حیوان و ارجاع آن به آزمایشگاه هماتولوژی و انگل‌شناسی گردید. گسترش‌های خونی ابتدا با الکل متانول مطلق ثابت شده و سپس با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند و در زیر میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر، آلودگی شدید به تیلریا آنولاتا و بابزیا باژمینا مورد تأیید قرار گرفت. درمان دارویی با استفاده از بوپارواکن با نام تجاری وتولکس محصول داروسازی ابوریحان (یک میلی‌لیتر برای بیست کیلوگرم وزن دام از طریق عضلانی به صورت تک‌دوز) و ایمیدوکارب دیپروپیونات با نام تجاری ایمیزول محصول شرکت شرینگ پلاو آلمان (دو و نیم میلی‌لیتر برای یکصد کیلوگرم وزن دام از طریق عضلانی به صورت تک‌دوز) و سرم درمانی انجام گردید. بسته به گونه بابزیا و شدت آلودگی منطقه می‌توان با تزریق یک دز ایمیدوکارب دیپروپیونات برای مدت ۴ تا ۶ هفته دام‌ها را از ابتلاء به بیماری ایمن نمود. حفاظت شیمیایی ایمیزول تا ۶ هفته باقی می‌ماند. لذا درگیر کردن

حیوانات در این مدت توسط کنه‌های آلوده به بابزیا سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد، که این ایمنی حدود ۱۵ ماه تداوم خواهد داشت. پس از طی دوره درمان، دام مبتلا به درمان‌های انجام گرفته پاسخ مناسبی نشان داد و به مرور از شدت نشانه‌های بالینی کاسته شد و بهبود یافت، به طوری که تب از بین رفت و تعداد ضربان قلب و تنفس و اشتها به حالت عادی بازگشت. در مقایسه انگل‌های مشاهده شده در این مورد با لام‌های خونی موجود در آرشیو آزمایشگاه هماتولوژی و انگل‌شناسی، شباهت کامل انگل‌ها به تیلریا آنولاتا و بابزیا باژمینا مورد تأیید قرار گرفت و با خصوصیات مرفولوژیک انگل‌های مشاهده شده در لام‌های آرشیو شده مطابقت داشت (نگاره ۱ و ۲). از نمونه خون تام استخراج DNA به عمل آمده و عملیات PCR بر روی آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بابزیا باژمینا و تیلریا آنولاتا جهت تکثیر قطعه ژنی srRNA ۱۸ انجام پذیرفت و به طور کلی سیستم واکنش PCR برای ۲۵ µl طراحی شد. اجزای واکنش PCR و حجم هر یک به این ترتیب بود: ۲/۵ µl پافر PCR، مقدار I.U. ۰/۱ از Taq polymerase، ۰/۵ µl از هر پرایمر (P1, P2)، ۱۲۵ µm از هر dATP، dTTP، dCTP، و dGTP، ۱/۵ µm. MgCl2، ۲/۵-۱/۲۵ µl از DNA الگو. پس از تهیه این مخلوط نمونه‌ها را در داخل دستگاه ترماسیکلر گذاشته و جهت را در ۳۸ سیکل زمان و درجه حرارت لازم به شرح ذیل تنظیم گردید. هر سیکل PCR شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای مرحله Denaturation time، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای مرحله Annealing time، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای مرحله Extention time و Final Extention ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. در پایان این مرحله نیز محصول PCR را بروی ژل آگارز ۲ درصد و بافر TBE الکتروفورز کرده و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در زیر اشعه UV دستگاه لومیناتور با استفاده از نتایج بدست آمده و با بررسی باندهای روی ژل رنگ‌آمیزی



نگاره ۳- نتایج بدست آمده از مرحله PCR جهت تشخیص بابزیا باژمینا :  
M: DNA Ladder، شماره ۲: باند حدود 1105bp نشان دهند وجود  
بالبزیا باژمینا، شماره ۱: کنترل منفی



نگاره ۴- نتایج بدست آمده از مرحله PCR جهت تشخیص تیلریا آنولاتا:  
M: DNA Ladder، شماره ۱: کنترل منفی، شماره ۲: کنترل مثبت، شماره ۳:  
باند 330bp نشان دهنده تیلریا آنولاتا.

### بحث

آلودگی بابزیا باژمینا و تیلریا آنولاتا بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع می‌باشد (۴). در این مناطق آلودگی از اوایل خرداد ماه شروع و معمولاً تا اواسط مهرماه ادامه می‌یابد (۵) تشخیص و تمایز آلودگی به این تک یاخته‌ها در مرحله حاد بیماری از طریق تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی

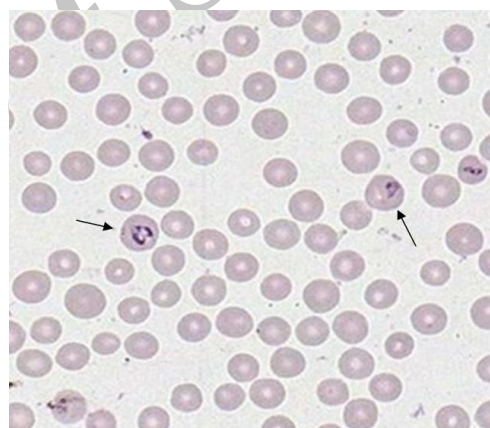
شده وجود بابزیا باژمینا و تیلریا آنولاتا مورد تأیید نهایی قرار گرفت (نگاره ۳ و ۴).

پرایمرهای مورد استفاده برای استخراج ژن 18s rRNA بابزیا باژمینا که توسط Chaudhry و همکاران استفاده شده بود (۹) عبارتند از:

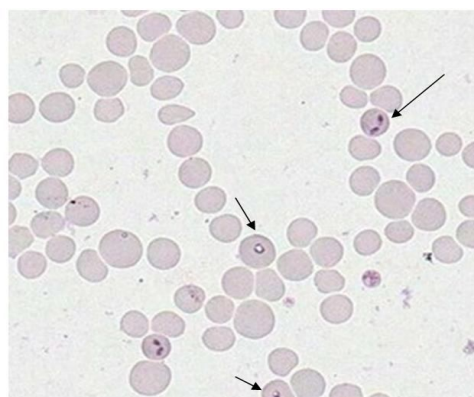
- بابزیا باژمینا، وزن محصول 1,124bp، ژن هدف 18s rRNA  
(Forward) 5'-TGGCGGCGTTTATTAGTTCG-3'  
(Reverse) 5'-CCACGCTTGAAGCACAGGA-3'

پرایمرهای مورد استفاده برای استخراج ژن 18s rRNA تیلریا آنولاتا که توسط Ali و همکاران توصیه شده بود (۹) عبارتند از:

- تیلریا آنولاتا، وزن محصول 341bp، ژن هدف 18s rRNA  
(Forward): CGGAAGGGCACCACCAGGC  
(Reverse): GCATCAGTGTAGCGCGGTG



نگاره ۱- بابزیا باژمینا داخل گلبول ای قرمز بزرگ نمایی ۱۰۰۰ X



نگاره ۲- آلودگی توأم گلبول‌های قرمز با بابزیا باژمینا و تیلریا آنولاتا، بزرگ نمایی ۱۰۰۰ X

مقارن می‌باشد و هر دو بیماری از بیماری‌های فصلی محسوب می‌شوند و بیشترین میزان وقوع آنها در ماه‌های خرداد، تیر و تا حدی مرداد می‌باشد. در برخی از مطالعات صورت گرفته در دامداری‌های اطراف تبریز، بیشترین میزان وقوع بیماری‌های ناشی از انگل‌های تک یاخته‌ای خونی، در ماه‌های مرداد و شهریور ثبت شده است (۴ و ۱۳، ۱). با توجه به اینکه مهمترین ناقل بیماری تیلریوزیس ناشی از تیلریا آنولاتا در ایران، گونه‌های مختلف کنه‌های هیالوما می‌باشد (۶) و بالاترین فعالیت این کنه‌ها در اطراف شهرستان تبریز، اواخر بهار و اوایل تابستان می‌باشد، وقوع بیماری بالینی آن هم به صورت ابتلاء توام به تیلریوزیس و بابزیوزیس در آذرماه، پدیده ای جالب و غیر مترقبه می‌باشد. به هر حال تبریز و استان آذربایجان شرقی از مناطق کوهستانی و نسبتاً سردسیر کشور محسوب می‌شود و طبیعتاً از میزان فعالیت کنه‌های ایکسودیده در فصل پائیز و زمستان کاسته خواهد شد، لذا بروز بیماری‌های ناشی از انگل‌های خونی در این فصول، وقوع پدیده ای جدید در بیولوژی کنه‌های ناقل را نشان می‌دهد، یا اینکه احیاناً تعداد محدودی کنه هنوز فعالیت داشته و قدرت ایجاد بیماری گسترده در سطح گله نداشته و توانسته‌اند تنها موارد انفرادی از بیماری را سبب شوند.

### فهرست منابع

- ۱- توسلی، م.، (۱۳۸۵): تک یاخته شناسی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد آذربایجانغربی،: ۲۰۰-۱۸۶.
- ۲- شمسی، م.، (۱۳۸۸): کلیات بند پایان در دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه ایلام: ۸۱-۵۷.
- ۳- توسلی، م.، (۱۳۸۸): روش کار آزمایشگاه تک یاخته شناسی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه ارومیه: ۹۰-۱۰۰.
- ۴- شاددل، ف.، (۱۳۷۷): انگل شناسی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز: ۶۴۶-۶۳۶.

آن با رنگ گیمسا و بررسی آن در زیر میکروسکوپ نوری میسر می‌باشد (۳). طبق گزارشات مربوط به سالهای قبل از گاوداریهای بومی و کلینیک‌های دامپزشکی این منطقه (بطور مکرر هر سال)، اغلب بیماریهای پیروپلاسموزی گاوان منطقه ناشی از تیلریا و آناپلازما بود. گزارشات متنوعی از شیوع بیماری تیلریوزیس و بابزیوزیس در ایران وجود دارد (۱). در مطالعه ای که توسط Harkirat و همکاران در هندوستان انجام گرفته، آلودگی توأم بابزیا باثرمینا و تیلریا آنولاتا در یک رأس گاو نژاد هولشتاین گزارش شده است (۱۱). صالح زاده و همکاران در سال ۱۳۹۰، آلودگی توأم به تیلریا آنولاتا و آناپلازما مارژیناله را گزارش کردند (۱۵). Madruga و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از آنالیزهای ژنتیکی و آنتی ژنتیکی وجود بابزیا باثرمینا را در گاوهای ۵ ناحیه برزیل اثبات کردند (۱۲) در بررسی دیگری که توسط Silva و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روشهای سرولوژی و nested-PCR جهت تشخیص بابزیا باثرمینا و بابزیا بوویس در کشور پرتغال انجام شد، از ۴۰۶ نمونه مشکوک به علائم بابزیوزیس گاوی ۷۹ درصد به بابزیا بوویس و ۵۲ درصد به بابزیا باثرمینا آلوده بودند (۱۶). در مطالعه ای دیگری که توسط Chaudhry و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور پاکستان بر روی ۱۰۰ گاو انجام دادند، ۲۹ درصد آلوده به بابزیا بودند که از این میزان ۱۱ درصد مربوط به آلودگی به بابزیا بوویس و ۱۸ درصد آلوده به بابزیا باثرمینا بودند (۱۰). تاکنون در ایران گزارشی از نظر وجود بابزیا در گاوهای مناطق روستایی و گاوداریهای کشور گزارشی نشده است. در گزارش حاضر آلودگی توأم به تیلریا آنولاتا و بابزیا باثرمینا برای اولین بار در ایران شرح داده شده است. در نهایت با استفاده از روش PCR بعد از الکترو فورز باندهای ۳۳۰ bp برای تیلریا آنولاتا و ۱۱۰۵ bp برای بابزیا باثرمینا مشاهده شدند که نتایج PCR مشاهدات میکروسکوپی را تأیید نمود. نکته حائز اهمیت دیگر این است که در اکثر موارد، فصل شیوع تیلریوزیس و بابزیوزیس با فصل فعالیت کنه‌های ایکسودیده

- Anaplasma marginale in cattle in kerman area, southeast of Iran. *Sci Parasitol.* 12:61-66.
- 16- Silva, G. (2009): First survey for Babesia bovis and Babesia bigemina infection in cattle from central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Vet. Parasitology.* 166: 66-72.
- ۵- شایان، پ.، (۱۳۸۶): استفاده از رنگ آمیزی ایمونولوژیک برای تشخیص بابزیوز و تیلریوز و بیان ژن پروتئین هسته‌ای وابسته به تکثیر سلولی در سلول‌های آلوده به تیلریا. *مجله دامپزشکی ایران*، (۳): ۲۹-۲۱.
- ۶- شایان، پ.، (۱۳۸۶): تشخیص و تمایز بابزیا و تیلریا بروی گسترش خونی رنگ آمیزی شده از طریق PCR. خلاصه مقاله، *مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)*، شماره ۶۲.
- ۷- صائبی، الف.، (۱۳۸۴): بیماری‌های انگلی در ایران (تک یاختگان)، چاپ اول، انتشارات آبیژ: ۲۴۲-۲۴۱.
- ۸- مظفری، ع.، (۱۳۸۶): بررسی فراوانی تیلریوز گاوی در گاوداری‌های شهرستان زاهدان. *مجله دامپزشکی ایران*، شماره ۳. (۳): ۷۰-۶۷.
- 9- Ali, A. E. F., Radwan M. E. I. (2011): Molecular detection of Theileria Annulata in egyptian buffaloes and biochemical changes associated with particular oxidative changes. *A. L. Sciences.* 1: 6-10.
- 10- Chaudhry, Z.I., Suleman, M., Younus, M. Aslim, A. (2010): Molecular detection of Babesia bigemina and Babesia bovis in crossbred carrier cattle through PCR. *Pakistan J.* 42:201-204.
- 11- Harkirat, S. (2011): Concurrent infection of Babesia bigemina and Theileria annulata in Holstein Friesian cow: A case report. *J Vet Parasitol.* 25: 82-3.
- 12- Madruga, C. (2002): Genetic and antigenic analysis of Babesia bigemina isolates from five geographical region of brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 22:153-160.
- 13- Nematollahi, A. (2004): The survey on prevalence of Theileriosis in Tabriz sheep. *Proceeding of 12<sup>th</sup> congress of Mediterranean Fedration for Health and Production of Ruminant.* Istanbul, Turkey, P: 84.
- 14- Nematollahi, A. (2008): Survey of tick species distribution in sheep and goat in Tabriz, Iran. *Proceeding of 25<sup>th</sup> congress of World Buiatrics congress, Budapest, Hungry,* 279: 84.
- 15- Saleh Zadeh, S., Fathi, S., Mirzaei Dehaghi, M., Norouzi Asl, E., Asgary Nezhad, H. (2011): Survey of Theileria annulata and