

# تشخیص ملکولی تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس در گاوهای شهرستان

## شهرضا، جنوب استان اصفهان

محمودرضا سلطانی<sup>۱</sup>، وحید نعمان<sup>۲\*</sup>، یاسر پیرعلی<sup>۳</sup>، حمیدرضا عزیزی<sup>۴</sup>

### چکیده

تیلریا‌ها از انگل‌های خونی مهم گاو می‌باشند که توسط کته‌های ایکسودیده منتقل شده و در دام‌های بیمار باعث تظاهرات بالینی خفیف تا بسیار کشنده می‌شوند. هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های تیلریا در شهرستان شهرضا در جنوب استان اصفهان بود. در مجموع تعداد ۲۵۳ نمونه خون از طریق رگ گوش و رگ وداج گاوهای به‌ظاهر سالم به‌طور تصادفی به ترتیب برای آزمون میکروسکوپی و ملکولی اخذ شد. در ابتدا DNA استخراجی از نمونه‌های خونی با جفت آغازگری که قطعه حدود ۴۰۰ جفت بازی از ژن ۱۸S rRNA جنس تیلریا را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. تمامی نمونه‌های مثبت با semi-nested PCR اختصاصی از نظر وجود تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس بررسی شدند و آلودگی نمونه‌ها از نظر تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس به ترتیب ۵۴/۹٪ و ۴۷٪ تشخیص داده شد. آزمون مربع کای جهت مقایسه میزان شیوع نسبت به فصل سال، نوع دامداری، بهداشت دامداری، ناقلین بندها، سن دام و تولید شیر انجام شد. در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اوریتالیس در گاو بین فصول مختلف نمونه‌گیری، حضور ناقلین و سطح بهداشتی دامداری اخلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<0.05). فراوانی به ترتیب مربوط به فصل بهار، حضور کته و سطح بهداشتی معمولی دامداری بود. در مقایسه آزمون میکروسکوپی با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱۴/۳۹٪ و ۹۹/۱۲ درصد تعیین گردید. محاسبه ضریب کاپا بین آزمون ملکولی و میکروسکوپی تیلریا (۵۰ فیلد) نشان‌دهنده سطح ضعیف توافق دو آزمون بود (Kappa=0.124). این مطالعه اولین مطالعه تشخیص ملکولی گونه‌های تیلریا در گاوهای منطقه جنوب اصفهان است.

واژگان کلیدی: ایران، استان اصفهان، گونه‌های تیلریا، گاو، تشخیص ملکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

### مقدمه

تیلریا‌ها در شاخه اپی کمپلکسا (Apicomplexa)، رده اسپوروزوا (Sporozoa)، راسته پیروپلاسمیدا (Piroplasmida) و خانواده تیلریده قرار می‌گیرند و از مهم‌ترین تک‌یاخته‌های خونی می‌باشند که توسط کته‌های سخت منتقل شده و بیماری ملایم تا کشنده در نشخوارکنندگان اهلی

و وحشی ایجاد می‌کنند (۱). تیلریا آنولاتا عامل اصلی بیماری تیلریوزیس گاو در ایران است که توسط کته به گاو منتقل می‌شود. تک‌یاخته تیلریا آنولاتا عامل تیلریوزیس گرمسیری و یا تیلریوزیس مدیترانه‌ای است و سالانه خسارت زیادی را به گاوهای مناطق مختلف ایران وارد می‌کند. تک‌یاخته تیلریا اوریتالیس یکی از گونه‌های خوش‌خیم تیلریا در ایران و جهان است که اوریتال تیلریوزیس را در گاو ایجاد می‌کند (۲). علائم بالینی ناشی از تیلریا اوریتالیس معمولاً همراه با دیگر انگل‌ها و یا ویروس‌ها جلوه‌گر می‌شود ولی در استرالیا، ژاپن و نیوزلند سویه‌هایی از این انگل یافت شده‌اند که به‌تنهایی علائم بالینی و حتی تلفات در گاو ایجاد می‌کنند (۳).

شناسایی گونه‌های تیلریا در دام‌های بیمار عمدتاً بر پایه تشخیص پیروپلاسم انگل در گسترش خون رنگ‌آمیزی شده با گیمسا می‌باشد ولی گونه‌های مختلف تیلریا از لحاظ مورفولوژی شبیه بوده و تشخیص پیروپلاسم‌ها بخصوص در دام‌های حامل که تعداد کمی از گلبول‌های قرمز آن‌ها آلوده است و در عفونت هم‌زمان گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا آسان نیست (۱). حساسیت و ویژگی کم روش‌های سرولوژیکی در مقایسه با روش‌های ملکولی، پاسخ‌های مثبت و منفی کاذب فراوان به علت بروز واکنش‌های متقاطع، عدم تشخیص دام مخزن یا موارد مزمن به علت افت عیار آنتی‌بادی و عدم تولید کیت‌های تجاری محدودیت‌های استفاده از این روش‌ها می‌باشند (۱). امروزه در مطالعات اپیدمیولوژیک تیلریوزیس گاو روش‌های مولکولی به علت دارا بودن حساسیت و ویژگی موردتوجه بیشتری

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران  
 ۲-دانشیار، بخش بیماریهای انگلی دام، موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، v.noaman@areeo.ac.ir  
 ۳-استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران  
 ۴-دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(جهت آزمایش ملکولی) در لوله حاوی ماده ضد انعقاد و همچنین پرسشنامه‌ای برای هر نمونه اخذ شد و نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی و بیولوژی ملکولی تحویل شدند.

در هر مراجعه به دامداری‌های از پیش تعیین‌شده، گاوها به‌طور تصادفی انتخاب و در هر مورد بازدید و نمونه‌گیری اطلاعاتی شامل نام دامدار، روستا/ منطقه، تعداد دام، کد دام، سابقه بیماری در گله، فصل (بهار، تابستان، پاییز)، نوع دامداری از نظر مدیریت (نیمه‌صنعتی، سنتی)، سطح بهداشتی دامداری (خوب، پایین، معمولی)، ناقلین بندپا در دامداری (مگس‌های گزنده، کنه)، سن دام (۱ تا ۳ سال، سه تا ۵ سال، بیش از ۵ سال)، وضعیت تولید شیر (بالا، پایین، معمولی، بدون تولید شیر) در فرم مربوطه ثبت و شماره فرم بر روی کلیه لوله‌ها و گسترش‌ها درج می‌شد. نژاد دام‌های نمونه‌گیری شده دو رگ و جنس همگی ماده بود و بر اساس گفته دامداران در کلیه دامداری‌ها سم‌پاشی علیه بندپایان انجام می‌شد.

#### بررسی گسترش‌های خونی با استفاده از میکروسکوپ نوری

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

#### استخراج DNA از خون

استخراج DNA به‌منظور به دست آوردن ماده ژنتیکی برای انجام PCR انجام شد. در این تحقیق از کیت استخراج DNA از خون و بافت شرکت (MBST ایران) و طبق دستورالعمل سازنده استخراج DNA انجام گرفت. جهت تعیین میزان و خلوص DNA استخراجی، چگالی نوری محصول موردنظر با استفاده از اسپکتروفتومتر و با طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت، علاوه بر این

قرارگرفته‌اند. PCR یکی از روش‌های مولکولی است که از حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص تیلریا برخوردار است و حتی می‌تواند گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا را از یکدیگر تفکیک نماید (۴).

با توجه به خسارات اقتصادی تیلریوزیس گرمسیری در ایران تحقیقات متعددی در خصوص شناسایی تیلریا آنولاتا، اپیدمیولوژی و ناقلین آن در استان‌های آذربایجان غربی، کردستان، کرمانشاه، مازندران، گلستان، خراسان، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، یزد، کرمان و سیستان و بلوچستان با روش‌های ملکولی و میکروسکوپی انجام شده است (۵). در خصوص شناسایی تیلریا اورینتالیس تحقیقات اندکی در ایران انجام شده است و این انگل تنها در استان‌های شمالی ایران مانند مازندران و گلستان مورد شناسایی قرارگرفته است (۲).

از آنجاکه در سال‌های گذشته موارد متعددی از انگل تیلریا در گسترش‌های خونی تهیه‌شده از گاوهای با علامت و بدون علامت توسط آزمایشگاه‌های دامپزشکی جنوب استان اصفهان گزارش شده بود لذا این تحقیق باهدف مطالعه ملکولی گونه‌های تیلریا در جمعیت گاوهای سنتی و نیمه‌صنعتی جنوب استان اصفهان و مقایسه دو روش ملکولی و مشاهده میکروسکوپی در شناسایی انگل تیلریا در جمعیت موردنظر انجام گرفت.

#### مواد و روش کار

##### جامعه آماری و روش نمونه‌گیری

مطالعه به‌صورت توصیفی - مقطعی بر روی ۲۵۳ گاو در گاوداری‌های نیمه‌صنعتی و سنتی جنوب استان اصفهان (شهرستان شهرضا) در سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی از ۵۰ گاوداری سنتی و نیمه‌صنعتی انجام و از هر دامداری حداقل از پنج گاو نمونه‌برداری انجام شد. از هر گاو یک گسترش خونی از ورید گوش (جهت آزمایش میکروسکوپی) و دو میلی‌لیتر خون از ورید وداج

DNA الگو به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر از واکنش PCR اولیه در حجم ۲۵ میکرولیتر بود. پس از ترکیب مواد مورد نیاز میکروتیوب ها به ترموسایکلر (بیو راد تی-۱۰۰)، ساخت آمریکا) در ۳۵ چرخه با برنامه دمایی زیر منتقل شد: واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشتی شدن دو رشته‌ی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال DNA در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی تیلریا آنولاتا ۵۷ و تیلریا اوریتالیس ۵۳ درجه سانتی‌گراد بود) به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر محصولات Semi-nested PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. با استفاده از کنترل مثبت تهیه شده از دوگونه تیلریا صحت آزمایش Semi-nested PCR در مورد هر گونه تایید شد. در مرحله آخر برای مشاهده باندها در سطح ژل، ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده شد (با رعایت تمام پروتکل های ایمنی) و پس از شست و شوی با آب مقطر برای نمایان شدن باندها و عکس برداری در دستگاه تابنده اشعه فرابنفش (ژل داک) قرار گرفت.

#### محاسبات آماری

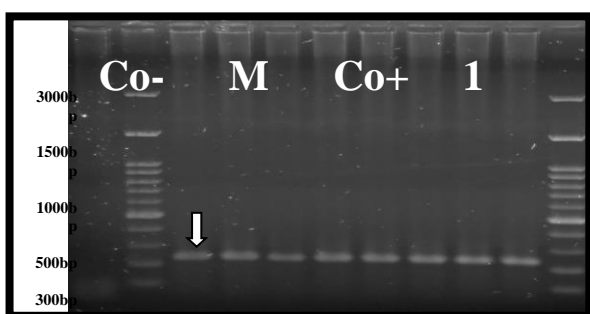
نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شدند. برای محاسبه فراوانی داده‌ها و برای پی بردن به اینکه کدام یک از فراوانی‌ها با یکدیگر اختلاف آماری معنی داری دارند، از آزمون مربع کای (۲) (استفاده شد. همچنین جدول توزیع شیوع ملکولی تیلریا در گاو بر اساس فصل، نوع دامداری از نظر مدیریت، سطح بهداشتی دامداری، ناقلین بندپا در دامداری، سن دام و وضعیت تولید شیر رسم شد. سطح معنی داری  $P\text{-value} \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. علاوه بر این حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی

DNA استخراجی بر روی ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

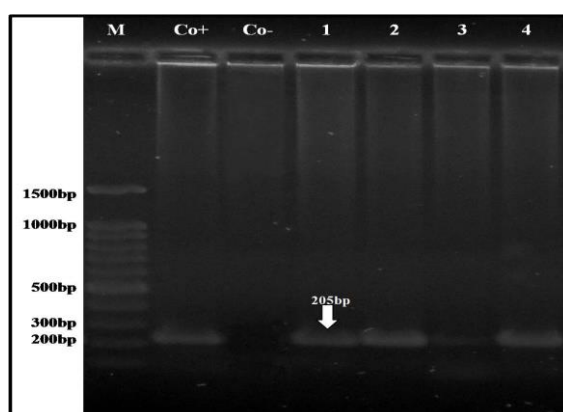
#### واکنش PCR و Semi-nested PCR

در این تحقیق برای شناسایی جنس تیلریا از دو آغازگر روبه جلو (5' ThBab1 CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3') و معکوس (5' ThBab2 CTAAGAATTTACCTCTGACAG 3') از ژن S rRNA۱۸ که قطعه‌ای در حدود ۴۳۰-۴۰۰ جفت باز را تشکیل می‌کردند استفاده شد (۶). ژن S rRNA۱۸ در قسمت متغیر خود (V4 دارای قسمت‌های مشخص و ثابت جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت تعیین گونه‌های تیلریا می‌باشد لذا با بررسی منابع از این ژن جهت آزمون ملکولی استفاده شد (۷، ۸). در واکنش Semi-nested PCR از دو آغازگر روبه جلو (5' T. annulata(F) CCTCTGGGGTCTGTGCA 3') و (5' T. orientalis (F) GGCTTATTTTCGGTTTGGATTTT 3') استفاده شد که محصول هر یک از این آغازگرهای اختصاصی با آغازگر معکوس ThBab2 برای تیلریا آنولاتا ۲۲۵ جفت باز و برای تیلریا اوریتالیس ۲۰۵ جفت باز بود (۷، ۸). کلیه واکنش‌ها در میکروتیوب های ۲۰۰ میکرو لیتری و در حجم ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر انجام شد: ۲/۵ میکرولیتر بافر (X10) PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ mM با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (10mM) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر روبه جلو ۲۰ μM با غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس ۲۰ μM با غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (5U/ μL) با غلظت نهایی ۰/۶۲۵ واحد در ۲۵ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر DNA الگو مخصوص هر نمونه و ۱۹/۱۲۵ میکرولیتر آب مقطر (دو بار تقطیر استریل). در واکنش Semi-nested PCR میزان

و وضعیت تولید شیر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در مقایسه آزمون میکروسکوپی با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱۴/۳۹ و ۹۹/۱۲ درصد تعیین گردید (جدول ۲). محاسبه ضریب کاپا بین آزمون ملکولی و میکروسکوپی تیلریا (۵۰ فیصد) نشان‌دهنده سطح ضعیف توافق دو آزمون بود ( $Kappa=0.124$ ).



نگاره ۱- تشخیص تیلریا آنولاتا در شهرستان شهرضا به روش Semi-nested PCR. ۱ تا ۷ نمونه‌های تکثیرشده با جفت آغازگر *T. annulata* (F) و *ThBab2*(R)، محصول *Co-*bp۲۲۵ - کنترل منفی، *Co+* - کنترل مثبت، *M*: مارکر ۱۰۰bp



نگاره ۲- تشخیص تیلریا اوریتالیس در شهرستان شهرضا به روش Semi-nested PCR. ۱ تا ۴ نمونه‌های تکثیرشده با جفت آغازگر *T. orientalis* (F) و *ThBab2*(R)، محصول *Co-*bp۲۰۵ - کنترل منفی، *Co+* - کنترل مثبت، *M*: مارکر ۱۰۰bp

نسبت به آزمون ملکولی محاسبه شد. علاوه بر این ضریب کاپا در خصوص تطابق دو آزمون محاسبه گردید.

## نتایج

درمجموع از ۲۵۳ گسترش خونی بررسی‌شده با میکروسکوپ نوری ۲۱ (۸/۳٪) نمونه از نظر حضور تیلریا آنولاتا شکل مثبت تشخیص داده شدند و در هیچ‌یک از نمونه‌ها تیلریا اوریتالیس تشخیص داده نشد. در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی تیلریا آنولاتا ۱۳۹ نمونه (۵۴/۹٪) از ۲۵۳ نمونه مورد آزمایش باند موردنظر را تشکیل دادند (نگاره ۱). در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی تیلریا اوریتالیس ۱۱۹ نمونه (۴۷٪) از ۲۵۳ نمونه مورد آزمایش باند موردنظر را تشکیل دادند (نگاره ۲). در مقایسه فراوانی گونه تیلریا آنولاتا در گاو از نظر نوع مدیریت دامداری، سطوح بهداشتی دامداری، حضور ناقلین بندپا در دامداری، سن دام و وضعیت تولید شیر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اوریتالیس در گاو بین فصول مختلف نمونه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به فصل بهار، تابستان و پاییز بود ( $p<0.0001$ ). در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اوریتالیس در گاو بین سطوح بهداشتی دامداری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین فراوانی مربوط به دامداری‌هایی بود که سطح بهداشتی معمولی داشتند ( $p<0.05$ ). در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اوریتالیس در گاو بین حضور ناقلین (کنه، مگس گزنده) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به دامداری‌هایی بود که کنه در آن‌ها حضور داشت ( $p<0.05$ ). در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اوریتالیس در گاو از نظر نوع مدیریت دامداری، سن دام

جدول ۱- توزیع شیوع ملکولی تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در گاوهای شهرستان شهرضا (جنوب استان اصفهان) در سال ۱۳۹۷

طبقه	سطح	تیلریا آنولاتا		تیلریا اورینتالیس		تعداد دام
		مثبت	P value	مثبت	P value	
		درصد	تعداد	درصد	تعداد	
کل	-	۵۴/۹	۱۳۹	۴۷	۱۱۹	۲۵۳
فصل	پاییز	۷/۵۱	۶۲	۵/۲۷	۳۳	۱۲۰
	بهار	۶/۶۳	۱۴	۲/۶۸	۱۵	۲۲
	تابستان	۸/۵۶	۶۳	۶۴	۷۱	۱۱۱
نوع دامداری	نیمه‌صنعتی	۵/۵۱	۵۰	۲/۴۱	۴۰	۹۷
	سنتی	۱/۵۷	۸۹	۶/۵۰	۷۹	۱۵۶
سطح بهداشتی دامداری	خوب	۶/۵۰	۳۹	۱/۳۵	۲۷	۷۷
	پایین	۸/۵۱	۵۷	۲/۴۸	۵۳	۱۱۰
	معمولی	۲/۶۵	۴۳	۱/۵۹	۳۹	۶۶
ناقلمین بندپا در دامداری	مگس‌گزنده	۱/۵۴	۱۱۹	۲/۴۳	۹۵	۲۲۰
	کنه	۶/۶۰	۲۰	۷/۷۲	۲۴	۳۳
سن دام	۱ تا ۳ سال	۱۰۰	۴	۲۵	۱	۴
	۳ تا ۵ سال	۵۳	۹۸	۸/۴۳	۸۱	۱۸۵
	بالای ۵ سال	۸/۵۷	۳۷	۸/۵۷	۳۷	۶۴
وضعیت تولید شیر	بالا	۸/۵۱	۴۳	۸/۳۹	۳۳	۸۳
	پایین	۵۱	۲۶	۸/۵۸	۳۰	۵۱
	معمولی	۸/۵۸	۷۰	۱/۴۷	۵۶	۱۱۹

p<0.05 \*

جدول ۲: حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی در مقایسه با ۱۰۰ درصد حساسیت و ویژگی آزمون ملکولی در تشخیص تیلریا در گاوهای حامل شهرستان شهرضا (جنوب استان اصفهان) در سال ۱۳۹۷.

روش آزمون	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت	حساسیت آزمون %	ویژگی آزمون %
ملکولی	۲۵۳	۱۳۹	۱۰۰	۱۰۰
میکروسکوپی	۲۵۳	۲۱	۱۴/۳۹ <sup>۱</sup>	۹۹/۱۲ <sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> حساسیت آزمون میکروسکوپی در تشخیص تیلریا = مثبت واقعی / (مثبت واقعی + منفی کاذب) \* ۱۰۰<sup>۲</sup> ویژگی آزمون میکروسکوپی در تشخیص تیلریا = منفی واقعی / (منفی واقعی + مثبت کاذب) \* ۱۰۰

## بحث

میکروسکوپی ۸/۳٪ از نمونه‌ها و در آزمون ملکولی ۵۴/۱۹٪ از نمونه‌ها از نظر تیلریا آنولاتا، مثبت تشخیص داده شدند. در مطالعات انجام شده در خصوص بررسی شیوع تیلریا آنولاتا در گاو با استفاده از روش میکروسکوپی و ملکولی در مناطق مختلف ایران و دنیا نیز نتایج مشابهی ثبت شده است که نشان‌دهنده حساسیت بالاتر آزمون‌های ملکولی نسبت به آزمون میکروسکوپی است: در جنوب شرقی ایران ۱۰/۶۶٪، نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۴۵/۳۳٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزویت از نظر تیلریا آنولاتا مثبت بودند (۱۰)، در منطقه سیستان ۶/۲۵٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۴۷/۵٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزویت از نظر تیلریا آنولاتا مثبت بودند (۱۱)، در هند ۲۳/۱۸٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۹۰/۴۷٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزویت از نظر تیلریا آنولاتا مثبت بودند (۱۲) و در پاکستان ۱/۱۹٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۱۹/۳٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن 18S rRNA از نظر تیلریا آنولاتا مثبت بودند (۱۳). تفاوت مشخص در شیوع تیلریا آنولاتا در مناطق یک کشور و کشورهای مختلف

تیلریوزیس یکی از بیماری‌هایی است که باعث محدودیت در توسعه صنعت دامپروری در آسیا و خاورمیانه شده است. این بیماری باعث مرگ‌ومیر بالا در گاوهای نژاد اصیل می‌شود، بنابراین دامداران مناطق کمتر برخوردار و سستی در به‌کارگیری این نژادهای پر تولید محدودیت داشته و نمی‌توانند با استفاده از جایگزینی نژادهای خارجی، تولید و بازده اقتصادی را بالا ببرند. علاوه بر این درمان گاوهای بیمار بسیار پرهزینه است و بیماری در گاو باعث کاهش وزن زنده، کاهش شیر، سقط‌جنین و در برخی موارد مرگ می‌شود. افت تولید شیر در گاوهای حامل انگل بین ۲۲ تا ۳۸ درصد از کل خسارت بیماری را به خود اختصاص می‌دهد (۹). در ایران علیرغم واکسیناسیون هنوز بیماری با افزایش فعالیت کنه‌ها در فصول گرم سال بروز پیدا می‌کند. حیوانات بهبودیافته از بیماری تا مدت‌ها به‌عنوان ناقل بیماری به حساب می‌آیند در این مرحله گلبول‌های قرمز آلوده به انگل به‌ندرت در گسترش خونی دیده می‌شوند؛ بنابراین به روش‌های تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا نیاز است تا بتوان گاوهای حامل را شناسایی کرد (۹). در مطالعه حاضر در آزمون

مطالعه آلودگی کمتری را داشتند (۲، ۱۵). در مطالعات ملکولی انجام شده با استفاده از ژنهای 18S rRNA و MPSP در هند، تایلند، چین و مصر شیوع این انگل به ترتیب ۷۸٪، ۳۰٪، ۲/۶٪ و ۰/۴۵٪ گزارش شده است (۱۶-۱۹).

در این مطالعه نیز مانند دیگر مطالعات انجام شده آلودگی توأم تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا در ۸۰ نمونه از ۲۵۳ نمونه (۳۱/۶٪) مشاهده شد (۲، ۱۵، ۱۹). فصل، سطوح بهداشتی دامداری و حضور ناقلین (کنه) از عوامل مؤثر در شیوع تیلریا اوریتتالیس در این تحقیق بودند. در مطالعه انجام شده در اصفهان نشان داده شده است که در اواسط بهار حضور کنه بر روی بدن گاوها افزایش می یابد و در تابستان به اوج خود می رسد و در پاییز از تراکم حضور کنه بر روی بدن دام کاسته می شود؛ بنابراین ارتباط فراوانی عامل بیماری با فصل فعالیت کنه در استان دور از ذهن نیست (۲۰). در بررسی های انجام شده در مصر عوامل سن، نژاد، اکولوژی منطقه، اقدامات مدیریتی، کنترل انگل های خارجی، حضور گونه های دیگر دام در دامداری، موقعیت دامداری از عوامل خطر شیوع تیلریا اوریتتالیس بودند (۱۹). در صورتی که در تایلند فقدان برنامه کنترلی کنه، آلودگی دام به کنه و چرا در مرتع و در چین سن بالای یک سال و ارتفاع بالای ۵۰۰ متر از سطح دریا به عنوان عوامل خطر شیوع تیلریا اوریتتالیس بودند (۱۷، ۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شیوع تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا نسبت به یافته های دیگر استانها و برخی از کشورهای آسیایی بالاتر است و فصل سال و حضور کنه در دامداری در این فراوانی مؤثر است. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان داد که آزمون ملکولی نه تنها قابلیت تفریق گونه های تیلریا را

ناشی از تنوع گسترش گونه های ناقل تیلریا، تفاوت اکولوژیکی، نوع آب و هوا، مدیریت گاو داری، مقاومت کنه ها به سموم، زمان نمونه گیری، سن، جنس و نژاد جمعیت تحت مطالعه و حساسیت و ویژگی آزمون های انتخابی دارد (۹). در مطالعه حاضر نوع مدیریت دامداری، سطوح بهداشتی دامداری، حضور ناقلین بندپا در دامداری، سن دام و وضعیت تولید شیر در فراوانی تیلریا آنولاتا اثر نداشت که با تحقیق انجام شده در منطقه سیستان مطابقت داشت (۱۱).

حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱۴/۳۹ و ۹۹/۱۲ درصد نسبت به آزمون ملکولی، تعیین شد و ضریب کاپا نشان دهنده سطح ضعیف توافق دو آزمون بود. آزمون های ملکولی می توانند یک گلبول آلوده به انگل را در ۱۰۰۰۰۰ گلبول سالم شناسایی کنند (۹) ولی بررسی میکروسکوپی شناسایی گونه های تیلریا بر اساس مشخصات مورفولوژیکی دارای حساسیت و ویژگی پایینی است زیرا تشخیص و تفریق فرم پیروپلاسمی در گلبول های قرمز گاوهای حامل جهت تشخیص گونه بسیار دشوار و وقت گیر است (۱). در مطالعات دیگر انجام شده حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی نسبت به آزمون ملکولی به ترتیب بین ۱۳-۵۷ درصد و ۹۹-۹۰/۴۷ درصد تعیین شده که نشان دهنده سطح ضعیف توافق یا عدم توافق دو آزمون بود و با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (۱۱، ۱۲، ۱۴).

در این مطالعه ۴۷٪ از نمونه ها با آزمون Semi-nested PCR از نظر تیلریا اوریتتالیس مثبت تشخیص داده شدند. در مطالعات دیگر انجام شده در استان های گلستان و آذربایجان غربی به ترتیب ۵/۶۲٪ و ۷/۷۸٪ از گاوها با آزمون ملکولی با استفاده از ژن 18S rRNA به تیلریا اوریتتالیس آلوده بودند که در مقایسه با این

- 8- Georges K, Loria G, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*. 2001;99(4):273-286.
- 9- Abdela N, Bekele T. Bovine theileriosis and its control: a review. *Advance Biology Research*. 2016;10(4):200-212.
- 10- Nourollahi-Fard SR, Khalili M, Ghalekhani N. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of native cattle by PCR and smear method in Southeast of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*. 2015;39(2):249-252.
- 11- Majidiani H, Nabavi R, Ganjali M, Saadati D. Detection of *Theileria annulata* carriers in Holstein-Friesian (*Bos taurus taurus*) and Sistani (*Bos taurus indicus*) cattle breeds by polymerase chain reaction in Sistan region, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016;40(4):1184-1188.
- 12- Khatoon S, Kolte S, Kurkure N, Chopde N, Jahan A. Detection of tropical bovine theileriosis by polymerase chain reaction in cattle. *Journal of Parasitic Diseases*. 2015;39(1):53-56.
- 13- Saeed Z, Iqbal F, Hussain M, Shaikh RS, Farooq U, A. A, et al. Molecular Prevalence and Haematology of Tropical Theileriosis in Cholistani Cattle from Nomadic Herds of the Cholistan Desert, Pakistan. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2016;22(2):281-286.
- 14- Noaman V. Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria* spp. in carrier cattle. *Journal of Parasitic Diseases*. 2014;38(1):64-67.
- 15- Narimani B, Hoghooghi-Rad N, Shayan P, Rahbari S. Molecular and Microscopic Detection of *Theileria* spp. among Cattle and Buffaloes in West Azarbaijan, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2017;72(3):189-195.
- 16- Devadevi N, Rajkumar K, Vijayalakshmi P, Perumal SV. Molecular Studies on Bovine Benign Theileriosis (*Theileria orientalis*) in Cattle of Puducherry Region. *Journal of Animal Research*. 2018;8(3):393-397.

دارد بلکه حساسیت آزمون ملکولی تقریباً هفت برابر آزمون میکروسکوپی می باشد.

### تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان که ما را در انجام این پایان نامه یاری نمودند تقدیر و تشکر انجام می شود.

### فهرست منابع

- 1- Kiara H, Steinaa L, Nene V, Svitek N. *Theileria* in ruminants. In: Florin-Christensen M, Schnittger L, editors. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Switzerland: Springer; 2018. p. 187-213.
- 2- Ghaemi P, Hoghooghi-Rad N, Shayan P, Eckert B. Detection of *Theileria orientalis* in Iran by semi-nested PCR. *Parasitology Research*. 2012;110(2):527-531.
- 3- Watts J, Playford M, Hickey K. *Theileria orientalis*: a review. *New Zealand Veterinary Journal*. 2016;64(1):3-9.
- 4- Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2015;4(1):104-118.
- 5- Soosaraei M, Haghi MM, Etemadifar F, Fakhari M, Teshnizi SH, Hezarjaribi HZ, et al. Status of theileriosis among herbivores in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary World*. 2018;11(3):332.
- 6- Shayan P, Rahbari S. Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. *Parasitology Research*. 2005;97(4):281-286.
- 7- Gubbels J, De Vos A, Van der Weide M, Viseras J, Schouls L, De Vries E, et al. Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(6):1782-1789.



- 17- Jirapattharasate C, Moumouni PFA, Cao S, Iguchi A, Liu M, Wang G, et al. Molecular epidemiology of bovine Babesia spp. and Theileria orientalis parasites in beef cattle from northern and northeastern Thailand. Parasitology international. 2016;65(1):62-69.
- 18- Zhou Z, Li K, Sun Y, Shi J, Li H, Chen Y, et al. Molecular epidemiology and risk factors of Anaplasma spp., Babesia spp. and Theileria spp. infection in cattle in Chongqing, China. PLoS One. 2019;14(7).
- 19- Rizk MA, Salama A, El-Sayed SA-E-S, Elsify A, El-ashkar M, Ibrahim H, et al. Animal level risk factors associated with Babesia and Theileria infections in cattle in Egypt. Acta Parasitologica. 2017;62(4):796-804.
- 20- Noaman V, Abdigoudarzi M, Nabinejad AR. Abundance, diversity, and seasonal dynamics of hard ticks infesting cattle in Isfahan Province, Iran. Archives of Razi Institute. 2017;72(1):15-21.