

# بررسی فراوانی آلودگی به تیلریا، بابزیا و آناپلازما در گاوهای استان البرز به روش‌های میکروسکوپی و PCR

محمد عبدلی\*<sup>۱</sup>، لیدا عبدالمحمدی خیابو<sup>۲</sup>

## چکیده

آناپلازموز، بابزیوز و تیلریوز از بیماری‌های انگلی می‌باشند که می‌تواند خسارات قابل توجهی به صنعت دامپروری وارد نمایند. علیرغم اهمیت بیماریزایی تیلریوز، بابزیوز و آناپلازموز در جمعیت دام‌های بزرگ، در ایران عمدتاً بررسی‌ها در نشخوارکنندگان کوچک صورت گرفته است. لذا هدف از این مطالعه تشخیص فراوانی آلودگی به تیلریا، بابزیا و آناپلازما در گاوهای استان البرز به روش‌های میکروسکوپی و PCR (Polymerase chain reaction) بود. بدین منظور از مجموع ۱۳۰ راس گاو خونگیری نموده و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌های اسمیر مثبت برای تشخیص مولکولی وارد بررسی شدند. از نمونه‌های خون استخراج DNA با روش فتل - کلروفرم صورت گرفت و آزمون مولکولی توسط پرایمرهای 18S rRNA، TamS و 16S rRNA جهت تشخیص جنس و گونه انجام شد. نتایج این مطالعه فراوانی فرم پیروپلاسمی توسط میکروسکوپ نوری را در ۹/۲۳ درصد از موارد نشان داد. یافته‌های آزمون 18S rRNA PCR در ۵/۳۸ درصد تائید کننده عفونت با تیلریا و بابزیا بود. همچنین نتایج آزمون PCR 16S rRNA در همه این موارد نشان‌دهنده عفونت با تیلریا آنولاتا بود. در ۳/۸۵ درصد نمونه‌ها آناپلازما تشخیص داد شد. در هیچ موردی آلودگی به بابزیا مشاهده نشد. با توجه به موارد آلودگی با تیلریا آنولاتا و بابزیای گوسفندی و اهمیت برخی گونه‌های بابزیا اهمیت مطالعات بیشتر برای ارزیابی این بیماری‌ها در راستای بهبود صنعت دامپروری ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: استان البرز، آناپلازما، بابزیا، گاو، تیلریا آنولاتا.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۸

## مقدمه

تیلریا و بابزیا متعلق به شاخه ایی کمپلکس‌ها، رده اسپوروزوا، زیر رده پیروپلازما می‌باشد که توسط کته منتقل می‌شود (۱). تیلریا عامل ایجاد بیماری تیلریوزیس در نشخوارکنندگان می‌باشد. یکی از گونه‌های مهم آن تیلریا آنولاتا می‌باشد که در گاو بیمارزاست (۲). بابزیا عامل بابزیوز یک بیماری تک‌یاخته‌ای خونی است که در حیوانات

اهلی، وحشی و گاهی انسان ایجاد بیماری می‌کند. گونه مهم بابزیوز که در گوسفند و بز ایجاد بیماری می‌نمایند بابزیا اویس می‌باشد (۱). آناپلازما متعلق به خانواده آناپلازما تاسه و راسته ریکتزیاله می‌باشد که توسط کته منتقل می‌شود. گونه مهم آن مارجیناله می‌باشد که در گاو اهمیت دارد (۳). برای اولین بار تیلریوز در ایران در سال ۱۳۱۴ با ورود گاو از فرانسه و تلف شدن چند راس از آن‌ها مورد توجه قرار گرفت. از سال ۱۳۱۵ تحقیق در مورد شناسایی این بیماری توسط دلپی انجام و عامل تیلریوز حاد در ایران تیلریا آنولاتا معرفی گردید (۲). بابزیوز در ایران توسط دلپی در سال ۱۹۳۶ در گوسفند و بز شناسایی و در سال ۱۹۸۱ توسط هاشمی و فشارکی جداسازی شد (۱). همچنین در سال ۲۰۰۹ اولین مورد آناپلازموز در این کشور در گاو شناسایی شد (۴). از گذشته یکی از چالش‌های اساسی بشر تأمین نیازهای غذایی بوده است. در این میان پرورش گاو از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. در ایران هر ساله مقادیر قابل توجهی از تولیدات دامی بنا به علل مختلفی از جمله بیماری‌های انگلی تیلریوز، بابزیوز و آناپلازموز از بین می‌روند. از سوی دیگر برنامه جامعی جهت کنترل بابزیوز و آناپلازموز در ایران وجود ندارد و حتی علیرغم برنامه واکسیناسیون برای تیلریوز گاوی مواردی از این بیماری‌ها به صورت پراکنده از اقلیم‌های متفاوت گزارش شد (۵، ۶). این بیماری‌های انگلی می‌توانند با تلف شدن دام، کاهش وزن و کاهش شدید تولید شیر خسارات قابل توجهی به دامپروران و اقتصاد کشور وارد نمایند (۷). روش‌های متعددی جهت تشخیص این بیماری‌ها وجود دارد. معمولاً به منظور

۱- بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریديا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران (abdolimohamad3@yahoo.com)  
۲- بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریديا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

### آزمون میکروسکوپی

از نمونه‌های خون ورید مارجینال گوش اسمیر تهیه و پس از فیکساسیون به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شد. اسمیرهای خون از نظر وجود پیروپلاسم با بزرگنمایی  $(1000 \times)$  مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. برای تأیید از نمونه‌های اسمیر مثبت، استخراج DNA با روش فنل کلروفرم صورت گرفت.

### استخراج DNA

برای این منظور ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده به نیم میلی‌لیتر نمونه خون اضافه شد. پس از سانتریفوژ به رسوب محلول پروتئیناز K و سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate) (SDS) اضافه گردید. در ادامه فنل-کلروفرم اضافه شد و ترسیب با اتانل صورت گرفت (۱۱). پس از افزودن بافر  $Tris\ EDTA\ 1X$  (TE1X) بر روی نمونه‌ها آزمون PCR برای دو ژن 18S rRNA و TamS برای تشخیص تیلریا و بابزیا و 16S rRNA برای تشخیص آناپلازما انجام شد.

### آزمون PCR

حجم نهایی هر واکنش برابر با ۵۰ میکرولیتر که متشکل از ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر بافر 10X ویژه PCR، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر Taq DNA polymerase (فرمتناز)، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۲/۵ میکرولیتر پرایمر forward و ۲/۵ میکرولیتر پرایمر reverse (سیناژن ایران) و ۳۱/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از سویه واکسینال تیلریا آنولاتا و خون یک گاو مبتلا به آناپالزما مارژیناله که دچار پارازیتمی شدید بود، به عنوان کنترل مثبت برای تأیید موارد تیلریوز و آناپالزموز به ترتیب استفاده شد. پرایمرهای TamS1 در جدول ۱ آورده شد. برای این منظور توالی ژن با نرم افزار آنالین از NCBI گرفته شد و بر اساس توالی ژن TamS1 با accession number

تشخیص از مشاهده میکروسکوپی خون با رنگ آمیزی گیمسا استفاده می‌گردد که نسبت به روش‌های دیگر از حساسیت و ویژگی کمتری برخوردار می‌باشد (۸). ولی هنوز در بسیاری از نقاط جهان و ایران به عنوان تکنیک تشخیصی استفاده می‌شود. امروزه به دلیل حساسیت و ویژگی بالای آزمون‌های سرولوژیکی نظیر ایمونوفلورسنت غیرمستقیم Indirect immunofluorescence Assay (IFA)، ثبوت کمپلمان (CF) Complement-fixation، الیزا Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) و آزمون مولکولی PCR از آن‌ها جهت انجام مطالعات تحقیقاتی استفاده می‌گردد (۹، ۱۰). علیرغم اهمیت این تک‌یاختگان تاکنون بررسی در این زمینه در استان البرز انجام نشده است. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از این تحقیق بررسی فراوانی آلودگی به تیلریا، بابزیا و آناپالزما در گاوهای استان البرز به روش‌های میکروسکوپی و PCR می‌باشد.

### مواد و روش کار

#### جمع آوری نمونه

در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ پس از ثبت مشخصات دام‌ها در پرسش‌نامه و کد دهی از ۱۳۰ راس گاو به ظاهر سالم شامل ۱۲۴ راس ماده (۹ راس نابالغ و ۱۱۵ راس بالغ) و ۶ راس نر (۱ راس نابالغ و ۵ راس بالغ) شهرستان‌های هشتگرد و ساوجبلاغ استان البرز به صورت تصادفی نمونه‌گیری به منظور مطالعه توصیفی و تحلیلی انجام شد. برای این منظور ورید مارجینال گوش و همچنین ورید وداجی ضد عفونی و خونگیری به عمل آمد. نمونه‌های خون از ورید وداج در ماده‌ی ضدانعقاد اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) (Ethylenediaminetetraacetic acid) و در کنار یخ نگه‌داری و فوراً به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

مربع کای و آزمون دقیق فیشر انجام شده است. در این تجزیه و تحلیل آلفا P مساوی ۰/۰۵ مبنای ارزیابی آماری در نظر گرفته شده است.

### نتایج

در بررسی میکروسکوپی از مجموع ۱۳۰ گسترش خونی در ۱۲ مورد (۹/۲۳ درصد) آلودگی به تک‌یاخته مشاهده شد که ۷ مورد مربوط به عفونت پیروپلاسمی تیلریا و ۵ مورد آن آناپلازما و یک مورد (۰/۷۷ درصد) عفونت توام دو تک‌یاخته بود (نگاره ۱) که در جدول ۲ به صورت انفرادی در هر دو مورد محاسبه گردید. از این تعداد در ۶ راس (۴/۸۴ درصد) ماده و ۱ راس (۱۶/۶ درصد) نر آلودگی به تیلریا آنولاتا مشاهده شد. همچنین در ۴ (۳/۲۲ درصد) ماده و ۱ راس (۱۶/۶ درصد) نر آلودگی به آناپلازما مشاهده شد. آلودگی به بابزیا در این مطالعه مشاهده نگردید. در مورد فراوانی تیلریوز در دام‌های بالغ نسبت به نابالغ ۶ مورد به ۱ مورد به.

(Z48739) توسط نرم افزار (Gene Runner program, Version 3.05) پرایمر اختصاصی طراحی شد. پرایمرهای اختصاصی 18s rRNA نیز بر اساس توالی ژن مورد نظر با accession # DQ866841.1 توسط نرم افزار Gene Runner طراحی شد (جدول ۱).

برنامه PCR دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) شامل واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در ۵۲ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و متعاقب آن گسترش نهایی برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر محلول رنگ (6X) مخلوط و درون چاهک‌های ژل آگاروز ۱ درصد ریخته شد و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید در نهایت توسط دستگاه ژل‌داک (Biocom) عکس-برداری انجام شد.

### تحلیل آماری داده‌ها

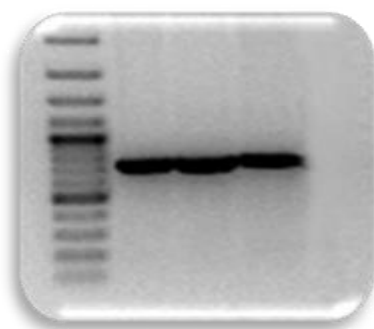
بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ به صورت توصیفی و تحلیلی انجام شد. تحلیل داده‌ها با آزمون

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

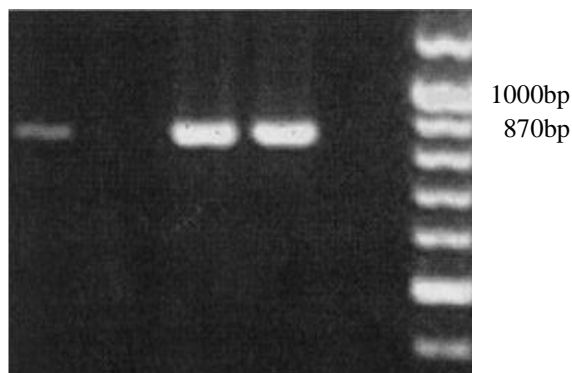
نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	شماره دسترسی (GenBank)	منبع
Tams1	F:ATGTTGTCCAGGACCACCCTCAAG R:GAT AAG TTG TTA CGA ACA TGG	۸۷۰	Z48739	(۱۲)
18s rRNA	F: CAGATACCGTCGTAGTCC R: CCTGTGTTACGACTTCTCC	۷۷۱	DQ866841.1	(۱۳)
16s rRNA	F: AAGATAATGACGGTACCTAC R: TTAGCTACAACACAGAGGCA	۳۹۰	LC432111.1	(۱۴)

جدول ۲- فراوانی تیلیریا آنولاتا و آناپلازما در جمعیت دام‌های تحت مطالعه در دو شهرستان هشتگرد و ساوجبلاغ

جنس	هشتگرد	ساوجبلاغ	فراوانی تیلیریا آنولاتا	فراوانی آناپلازما	مجموع فراوانی در هر جنس
ماده	۴۸	۷۶	۶ (۴/۸۴ درصد)	۴ (۳/۲۲ درصد)	۱۰ (۸/۰۶ درصد)
نر	۲	۴	۱ (۱۶/۶ درصد)	۱ (۱۶/۶ درصد)	۲ (۳۳/۳۳ درصد)
مجموع موارد	۵۰	۸۰	۷ (۵/۳۸ درصد)	۵ (۳/۸۵ درصد)	۱۲ (۹/۲۳ درصد)

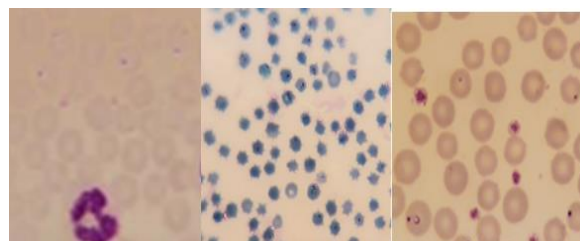


نگاره ۲- نتایج الکتروفورز تکثیر ژن 18 SrRNA جهت شناسایی عفونت پیروپلاسمی (نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) چاهک ۱ لدر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ کنترل مثبت (سویه واکسینال تیلیریا آنولاتا)، چاهک شماره‌های ۳ و ۴ نمونه‌های استان البرز و چاهک ۵ کنترل منفی.



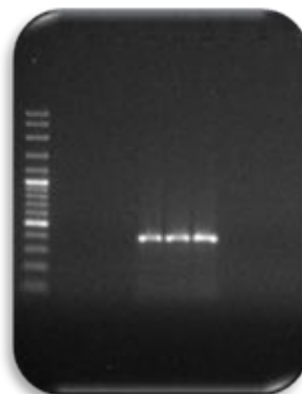
نگاره ۳- نتایج الکتروفورز تکثیر ژن Tams1 جهت شناسایی تیلیریا آنولاتا (نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱% رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) چاهک شماره‌های ۱ و ۲ و ۳ نمونه‌های استان البرز و چاهک ۴ کنترل مثبت (سویه واکسینال تیلیریا آنولاتا)، چاهک ۵ کنترل منفی چاهک ۶ لدر ۱۰۰ جفت بازی.

ترتیب بدست آمد. همین نتیجه برای آلودگی با آناپلاسموز حاصل شد. نتایج آزمون PCR با استفاده از شش پرایمری که در جدول ۱ مشخص شده، در ۷ مورد (۵/۳۸ درصد) برای ژن 18S rRNA در تیلیریا ایجاد قطعه ۷۷۱ جفت بازی نموده که تأیید کننده عفونت پیروپلاسمی با تیلیریا و بابزیا می‌باشد (نگاره ۲). همچنین نتایج آزمون PCR برای ژن Tams1 در همه این موارد ایجاد قطعه ۸۷۰ جفت بازی نموده که تأیید کننده عفونت با تیلیریا آنولاتا است (نگاره ۳). در مورد PCR برای ژن آناپلازما در ۵ مورد از ۱۳۰ نمونه (۳/۸۵ درصد) آلودگی تشخیص داده شد (نگاره ۴). در هیچ موردی آلودگی به بابزیا مشاهده نشد. نتایج یافته‌های فراوانی برای تیلیریا آنولاتا و آناپلازما در جدول ۲ آورده شده است.



نگاره ۱- سمت راست عفونت توام تیلیریا آنولاتا و آناپلازما وسط تیلیریا آنولاتا و سمت چپ آناپلازما (رنگ‌آمیزی گیمسا، درشت‌نمایی 1000X).

بیان گر آن است که جمعیت گاوهای ایران بیش تر به بیماری تیلریوز مبتلا می شوند. به عنوان مثال در بررسی جم پور و همکاران در شهرستان گرمسار موارد ابتلا زیادی به تیلریا گزارش شد (۵). البته این میزان فراوانی در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر و دارای رطوبت نسبی بالا بیشتر می باشد (۱۶). به عنوان مثال بیشترین میزان آلودگی با تیلریا آنولاتا در استان خوزستان ۶۵/۸۳ درصد و در کهگیلویه و بویراحمد ۵۷/۴۴ درصد گزارش گردید (۶). برعکس عفونت بابزیا در گاو شیوع کمتر و در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) شیوع بیشتری دارد (۷). بر اساس نتیجهی مطالعه حاضر، فراوانی تیلریوز در استان البرز بیشتر از سایر انگل های خونی بود. آناپلازما پس از تیلریا از فراوانی بالایی در گاوهای این استان برخوردار بود. در حالی که در هیچ موردی عفونت با بابزیا مشاهده نشد. نتیجه این بررسی نزدیک به نتایج فخار و همکاران و خمیس پور و همکاران در ایران بود که گزارش کردند میزان شیوع گونه های بابزیا در گله های گاو ایران بین ۰-۲ درصد متغیر است (۱۷، ۱۸). در گذشته اکثر مطالعات صورت گرفته در زمینه تشخیص گونه تیلریوز و بابزیوز بر اساس آزمایش میکروسکوپی بوده که از حساسیت و ویژگی کمی برخوردار است. لیکن این روش ها اختصاصی نیستند و امکان واکنش متقاطع در بین گونه ها وجود دارد. همچنین احتمال نتایج مثبت و منفی کاذب در فاز اولیه عفونت و موارد حامل یا موارد با پارازیتی کم وجود دارد (۸). برعکس روش های مولکولی از جمله PCR، حساسیت و ویژگی بالایی در شناسایی تک یاخته های بابزیا و تیلریا دارند. همچنین می تواند موارد حامل را شناسایی نماید که در روش آزمایش مستقیم امکان پذیر نیست. امروزه از روش های دیگر تشخیصی نظیر روش های سرولوژیک ثبوت کمپلمان، ایمنوفلورسانت غیرمستقیم و الیزا به منظور تشخیص استفاده می شود (۹، ۱۰). رزمی و خداوردی در سال ۲۰۰۸ میزان



نگاره ۴- نتایج الکتروفورز تکثیر ژن 16S rRNA جهت شناسایی عفونت آناپلازما (نمونه ها روی ژل آگاروز ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) چاهک ۱ لدر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ خالی، چاهک ۴ و ۵ نمونه های استان البرز، چاهک ۶ کنترل مثبت

نتایج تحلیل داده ها با آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر نشان داد اختلاف آماری معنی دار بین جنس، سن (بلوغ و عدم بلوغ) و وضعیت ابتلا به تیلریا آنولاتا و آناپلازما وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

#### بحث

در ایران هر ساله مقادیر قابل توجهی از تولیدات دامی بنا به علل مختلفی از جمله بیماری های انگلی دامی از بین می روند. آناپلازما، بابزیوز و تیلریوز که اغلب نشخوارکنندگان را درگیر می کنند با تلف شدن دام، کاهش وزن و کاهش تولید شیر خسارات قابل توجهی را به دامپروران و اقتصاد کشور وارد می نمایند (۷). به علاوه هزینه مبارزه با کنه را نیز به صنعت دامداری وارد می نماید. پیشینه تحقیقات در ایران در زمینه شیوع تیلریوز، بابزیوز و آناپلازما از شیوع این بیماری ها در اقلیم ها و میزبان های مختلف است (۱۵). فراوانی این بیماری ها به عوامل متعددی نظیر نژاد دام، انتقال دام، سن و وضعیت بدن دام، بارداری، تغییرات ناگهانی محیط و اضطراب بستگی دارد (۶). با توجه به نتایج مطالعات انجام شده در ایران در اقلیم های مختلف کشور

مطالعات بیشتر در این زمینه صورت گیرد. همچنین با طراحی پرایمرهای اختصاصی و انجام Multiplex PCR در حداقل زمان گونه‌های تیلریا و بابزیا را شناسایی نمود.

### فهرست منابع

1. Kalani H, Fakhar M, Pagheh A. An overview on present situation babesiosis and theileriosis and their distribution of ticks in Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2012;5(4):59-71.
2. vosughi H, Goudarzi R. Prevalence of bovine theileriosis in Boroujerd city. *Veterinary Histobiology* 2013;1(2):65-9.
3. Noaman V. A review of anaplasmosis and the prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Iran and the world. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*. 2017; 116: 2-15.
4. Noaman V, Nabinejad A, Shahmoradi A, Esmailkhanian S. Molecular detection of bovine leukocytic *Anaplasma* species in Isfahan, Iran. *Research in Molecular Medicine*. 2016;4(2):47-51.
5. Jampour M, Tehrani Sharif M, Alavi S, Abil M. Determination of the prevalence rate of cutaneous theileriosis in infected cattle with theileriosis in Garmsar, Iran. *The 15th Iranian Veterinary Congress; Tehran, Iran*. 2008.
6. Dehkordi FS, Parsaei P, Saberian S, Moshkelani S, Hajshafiei P, Hoseini S, et al. Prevalence study of *T. annulata* by comparison of four diagnostic techniques in Southwest Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2012;15(2):123-130.
7. Razmi G, Pourhosseini M, Yaghfour S, Rashidi A, Seidabadi M. Molecular detection of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in sheep and ixodid ticks from the northeast of Iran. *The Journal of parasitology*. 2013;99(1):77-81.
8. Almería S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrada-Peña A, Gutierrez J. Bovine

آلودگی به تیلریا آنولاتا را در ۳۵ گاو دارای علائم بالینی شهرستان مشهد به دو روش میکروسکوپی و PCR به ترتیب ۱۰ مورد (۲۸/۵ درصد) و ۱۸ مورد (۵۱/۴ درصد) گزارش نمود (۱۹). حیدرپور بمی و همکاران نیز ارزیابی در پنج ناحیه نیمه شرقی ایران (زابل، لار، فردوس، سمنان و گرگان) انجام دادند که نتیجه مشابهی بدست آمد (۲۰) که نشان- دهنده اختصاصیت بیشتر PCR می‌باشد. در اکثر مطالعات، به منظور تشخیص تیلریا با آزمون PCR از ژن 18S rRNA استفاده می‌گردد و از ژن *Tams* جهت تفریق گونه‌های تیلریا استفاده می‌شود (۲۱). در این بررسی برای تأیید موارد اسمیر مثبت، آزمون مولکولی انجام شد که در تمامی موارد وجود عفونت تأیید گردید. از سوی دیگر فراوانی موارد مثبت در جنس ماده بیشتر از نر بود؛ هر چند این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ). نتایج این مطالعه نشان داد فراوانی تیلریا آنولاتا در دو رده سنی نابالغ و بالغ تقریباً مشابه است و اختلاف معنی‌داری وجود ندارند. در مورد فراوانی آناپلاسموز نیز همین وضعیت مشاهده می‌شود ( $P > 0.05$ ). در مطالعه‌ی رزمی و همکاران در سالهای ۲۰۰۳ و ۲۰۰۶ نتایج مشابه این مطالعه در ارتباط با سن و جنس گوسفندان آلوده به این انگل‌های خونی در اهواز به دست آورد (۲۲، ۲۳). بر اساس این اطلاعات به نظر می‌رسد هر دو جنس دام‌ها در گاو و گوسفند به میزان برابری نسبت به آلودگی با این انگل‌ها حساس هستند. در مجموع یافته‌های پژوهش اخیر آلودگی گاوهای این استان را به تیلریا آنولاتا و آناپلازما نشان می‌دهد. لذا استفاده از گوشت و شیر آلوده می‌تواند مشکلات جدی را برای سلامت انسان ایجاد نماید. بنابراین اتخاذ راه‌حلی جهت کنترل و پیشگیری از بیماری- های فوق‌الذکر ضروری به نظر می‌رسد. پیشنهاد می‌شود با توجه به اهمیت برخی گونه‌های بابزیا و موارد بالای آلودگی با تیلریا آنولاتا و بابزیای گوسفندی در ایران و نیز مطالعات محدودی که در این زمینه در انسان صورت گرفته است،

- piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Veterinary Parasitology*. 2001;99(3):249-59.
9. Böse R, Jacobson R, Gale K, Waltisbuhl D, Wright I. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitology research*. 1990;76(8):648-52.
  10. Silva MG, Henriques G, Sanchez C, Marques PX, Suarez CE, Oliva A. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Veterinary parasitology*. 2009;166(1-2):66-72.
  11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
  12. Shiels BR, d'Oliveira C, McKellar S, Ben-Miled L, Kawazu S-i, Hide G. Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of *Theileria* parasites. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995;72(1-2):149-62.
  13. García-Sanmartín J, Aurtenetxe O, Barral M, Marco I, Lavin S, García-Pérez A, et al. Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology*. 2007;134(3):391.
  14. Amer S, Kim S, Yun Y, Na K-J. Novel variants of the newly emerged *Anaplasma capra* from Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) in South Korea. *Parasites & vectors*. 2019;12(1):365.
  15. Noaman V, Shayan P. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in carrier cattle of Iran-first documented report. *Iran J Microbiol*. 2009;1(2):37-42.
  16. Mahmoudvand P, Varshosaz M, Nayebzadeh H, Rocky A, Pourmahdi Borujeni M. Study the frequency of blood parasites of sheep in Dezful suburb, southwest Iran. *Iranian Veterinary Journal*. 2019;15(3):68-77.
  17. Fakhar M, Hajihassani A, Maroufi S, Alizadeh H, Shirzad H, Piri F, et al. An epidemiological survey on bovine and ovine babesiosis in Kurdistan Province, western Iran. *Tropical animal health and production*. 2012;44(2):319-22.
  - 18- Khamesipour F, Doosti A, Koohi A, Chehelgerdi M, Mokhtari-Farsani A, Chengula AA. Determination of the presence of *Babesia* species in blood samples of cattle, camel and sheep in Iran by PCR. *Archives of Biological Sciences*. 2015;67 (1):83-90.
  19. Razmi G, Khodaverdi M. Diagnosis of *Theileria annulata* in cattle with subclinical or clinical symptoms by polymerase chain reaction (PCR). 15th Iranian Veterinary Congress; Tehran, Iran. 2008.
  20. Heidarpour Bami M, Khazraiiinia P, Haddadzadeh H, Kazemi B. Identification of *Theileria* species in sheep in the eastern half of Iran using nested PCR-RFLP and microscopic techniques. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2010;11(3):262-6.
  21. Esmaelizad M, Niaraki SJ, Fesharaki RH. Molecular and phylogenetic analysis of the partial *tams1* gene sequence of a vaccine strain of *Theileria annulata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011;54(6):1109-16.
  22. Razmi GR, Eshrati H, Rashtibaf, M. Prevalence of *Theileria* spp. infection in sheep in South Khorasan province, Iran. *Veterinary Parasitology*. 2006;140 (3-4):239-243.
  23. Razmi GR, Hosseini M, Aslani MR. Identification of tick vectors of ovine theileriosis in an endemic region of Iran. *Veterinary Parasitology*. 2003; 116 (1):1-6.

