مطالعه وقوع آلودگی به گونه‌های مختلف تک یاخته تیلریا با روش Nested PCR-Semi در دامداری‌های سنتی دو منطقه اکولوژیکی استان گلستان

پیمان قائمی [۱*]، ناصر حقوقی راد [۲]، پرویز شایان [۳]، بریگیته اکرت [۳]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ـ ایران.

۲- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ـ ایران.

۳- موسسه پژوهشی انتقال سامانه‌های بیولوژی مولکولی (MBST)، تهران ـ ایران.

*نویسنده مسئول: vetiran@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۰ تیر ۹۰، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۹۰

چکیده

امروزه روش‌های مولکولی بدلیل دارا بودن حساسیت و ویژگی بالا، بیشتر از روش‌های قدیمی تر مانند روش رنگ آمیزی گیمسا و روش‌های سرولوژی برای جداسازی پیروپلاسم‌ها در حیوانات بکار گرفته می‌شوند. بنابراین به‌منظور تشخیص آلودگی به تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در گاوداری‌های سنتی دو منطقه اکولوژیکی استان گلستان، نمونه خون ۱۶۰ راس گاو طی سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ تحت آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه استخراج DNA از همه نمونه‌های خونی صورت پذیرفت و پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A برای تفریق گونه‌های تیلریا و بابزیا از یکدیگر در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. کلیه نمونه‌های مثبت PCR اولیه با پرایمرهای اختصاصی تیلریا آنولاتا (Ta-S/Tbs-A) و پرایمرهای اختصاصی تیلریا اورینتالیس (To-S/Tbs-A) تحت آزمون Semi-Nested PCR قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که ۱۰ درصد گاوهای مورد بررسی در مناطق خشک و ۵ درصد گاوهای مورد بررسی در مناطق مرطوب استان گلستان آلوده به تیلریا آنولاتا و ۸/۷۵ درصد گاوهای مورد بررسی در مناطق خشک و ۲/۵ درصد گاوهای مورد بررسی در مناطق مرطوب استان گلستان آلوده به تیلریا اورینتالیس می‌باشند. در این بررسی از یک سو برای اولین بار تیلریا اورینتالیس با روش مولکولی در ایران و از سوی دیگر برای اولین بار آلودگی توام تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در ایران گزارش می‌شود. مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۱، ۵۹-۵۱.

واژه‌های کلیدی: دامداری سنتی، استان گلستان، تیلریا آنولاتا، تیلریا اورینتالیس.

Study on the protozoal infection of *Theileria* species in Traditional animal husbandry in two ecological regions of Golestan province, Iran

Ghaemi, P.[1*], Hoghooghi-Rad, N.[2], Shayan, P.[3], Eckert, B.[3]

[1]*Young Researchers club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[2]*Department of Parasitology and Mycology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[2]*Investigating Institute "Molecular Biological System Transfer (MBST)", Tehran, Iran.*

Abstract

Nowadays molecular assays, due to their high sensitivity and specificity rates, are more employed than the traditional methods, e.g. Giemsa staining and serology, for detection of piroplasmosis in domestic animals. Therefore, in order to diagnose *Theileria annulata* and *Theileria orientalis* in traditional cattle breeding in two ecological regions of Golestan province, north of Iran, we examined the blood samples of 160 cattle during 2009 to 2010. DNA was extracted from all blood samples. Tbs-S/Tbs-A primer set was used to amplify the both Genus of *Theileria* and *Babesia* species in PCR step. For detection and differentiation of *Theileria annulata* from *Theileria orientalis*, we examined all positive cases by Semi-Nested PCR method, using specific primers. The results revealed 10% of native cattle in dry areas as well as 5% of native cattle in wet areas harbored *Theileria annulata*, whereas the infection rate of *Theileria orientalis* in dry areas was 8.75% and in wet areas was 2.5%. This is the first report from Iran indicating the presence of *Theileria orientalis* and the mixed infection of both *Theileria* in native cattle of the country, confirmed by molecular procedures. ***J. Vet. Microbiol. 7,1:51-59, 2011.***

Keywords: Traditional animal husbandry, Golestan province, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis*.

مقدمه

بیماری تیلریوز ناشی از تیلریا آنولاتا در گاو یکی از بیماریهای مهم و خطرناک مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که همه ساله در این مناطق و منجمله ایران تلفات و خسارات اقتصادی زیادی را به دامداران وارد می‌نماید. (۱۰و۱،۹) با وجود مطالعات گسترده ای که پیرامون روش‌های تشخیص، پیشگیری، کنترل، درمان، بیماریزایی، ویژگی‌های اپیدمیولوژیک، پاتولوژیک و غیره انگل تیلریا توسط پژوهشگران مختلف در داخل و خارج از کشور صورت گرفته است، اما همچنان این بیماری تلفات نسبتاً بالایی را در نژادهای غیر بومی و دورگ ایجاد می‌کند و خسارت‌های سنگینی را به دامداران تحمیل می نماید و به همین دلیل نیز همچنان در کانون مطالعات محققین بویژه در کشورهایی است که این بیماری بصورت بومی در آن مناطق شایع است(۳). تاکنون تیلریا آنولاتا با روش‌های مورفولوژی، سرولوژی و مولکولی (۱،۲،۳،۴،۱۰و۱۴) و تیلریا اورینتالیس با روش‌های مورفولوژی و سرولوژی (۲۰) از گاوهای ایران گزارش شده‌اند. گونه تیلریا آنولاتا بیماریزا بوده و از نظر اقتصادی مهم می‌باشد، اما تیلریا اورینتالیس عموماً بیماری زا نبوده و یا بیماری خفیفی ایجاد می‌نمایند(۲۰). تشخیص دقیق به همراه حساسیت فوق العاده در شناسایی حاملین فاقد نشانه‌های مشخص بیماری، یکی از اهداف مهم بررسی‌های اپیدمیولوژیک محسوب می‌شود. لذا در بین روش‌های تشخیصی با حساسیت قابل قبول، روش PCR با حساسیت و ویژگی بالایی همراه بوده، بطوریکه قابلیت تشخیص یک سلول آلوده را نیز دارا می‌باشد (۲). از آنجایی‌که تا کنون بررسی‌های مولکولی این دو تک یاخته در استان گلستان صورت نپذیرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، تعیین میزان آلودگی به گونه‌های تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در گاوداری های سنتی استان گلستان و به تفکیک دو منطقه اکولوژیکی خشک و مرطوب با روش جدید Nested PCR-Semi می‌باشد.

مواد و روش کار

۱. جمع آوری و نگهداری نمونه خون:

استان گلستان یکی از استان‌های شمالی کشور بوده که آب و هوای خشک تا مرطوب را در آن می توان مشاهده کرد. استان گلستان از دو بخش جلگه ای و کوهستانی تشکیل شده است. بخش جلگه‌ای استان خود از دو قسمت شمالی با خصوصیات خشک و بیابانی و جنوبی با خصوصیات نیمه خشک تا مرطوب تشکیل شده است (۸). بر اساس تنوع آب و هوایی استان گلستان و نظر برخی از کارشناسان دامپزشکی مبنی بر بالاتر بودن میزان آلودگی به تیلریا آنولاتا در مناطق خشک استان ۸۰ نمونه از شهرستان های شمالی با آب و هوای خشک (شهرستان‌های گنبد کاووس، آق قلا، بندر ترکمن و کلاله) و ۸۰ نمونه نیز از شهرستان‌های جنوبی با آب و هوای مرطوب (شهرستان‌های کردکوی، گرگان، بندرگزو علی آباد کتول) و از هر شهرستان تعداد ۲۰ نمونه اخذ گردید. تمامی نمونه‌های اخذ شده طی این بررسی از نژاد دورگ و با سن بالای یک سال و از دامداری‌های سنتی استان بودند. پس از مقید کردن گاوها، از هر یک از آنها ۵ میلی‌لیتر خون از ورید زیر دم با استفاده از لوله ونوجکت گرفته شد. سپس با اضافه کردن هم حجم آن از الکل اتانول خالص مرک به آرامی آن را تکان داده تا خون بطور کامل لخته شود. همچنین تمام سطح بدن هر گاو از نظر حضور کنه‌ها مورد بررسی قرار می‌گرفت و در صورت وجود کنه با پنس اقدام به جداسازی آن شده و در ظروف درب دار حاوی الکل ۷۰ درصد مرک قرار داده می‌شد. سپس کلیه مشخصات گاو اعم از سن، جنس، نژاد، منطقه، نام صاحب دام و تاریخ نمونه برداری و سایر اطلاعات مورد لزوم برای هر نمونه ثبت و کد مربوطه برروی نمونه نیز درج شد و به آزمایشگاه ارسال گردید.

۲. استخراج DNA از خون:

ابتدا مقداری از لخته خون درون اتانول خالص مرک با استفاده از سر سمپلر استریل برداشته شده و در یک تیوب اپندورف استریل ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد تا در دمای آزمایشگاه کاملاً خشک و عاری از الکل گردد. سپس کار استخراج DNA با استفاده از کیت مخصوص (Kit, MBST, Iran DNA Extraction) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. محلول حاوی DNA استخراجی از هر نمونه با نصب مشخصات کامل روی لوله، در ۲۰- درجه سانتیگراد جهت اقدامات بعدی نگهداری شد.

۳. ارزیابی DNA استخراج شده:

جهت ارزیابی میزان DNA استخراج شده، DNA استخراج شده از هر نمونه برروی ژل آگارز ۱ درصد الکترورفورز شده و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی قابلیت انجام PCR روی DNA استخراج شده، هر یک از آنها با

پرایمرهای اختصاصی مشتق شده از ژن کد کننده بتا اکتین گاو مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۳-۱. آنالیز DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده از الکتروفورز مستقیم:

بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده مخلوط شده، سپس بر روی ژل آگارز ۲ درصد با استفاده از تانک الکتروفورز MBST)) حاوی بافر ۰/۵x TBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV، باندهای جدا شده قابل رویت گردیدند. باندهای ایجاد شده در این مرحله به علت سنگین بودن DNAهای استخراج شده، اندکی پائین تر از چاهک‌ها مشاهده شدند.

۳-۲. آنالیز DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده از روش PCR:

در ابتدا جهت اطمینان از استخراج صحیح DNA، بر روی هر نمونه یک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bba-S و Bba-A منشعب از ژن کد کننده پروتئین بتا اکتین گاو انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز، اندازه محصول PCR در این مرحله ۶۳۹ جفت باز بود.

۴. تفریق انگل‌های تیلریا و بابزیا در خون با استفاده از روش PCR:

بدین منظور بر روی هر نمونه یک PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده ۱۸ S rRNA انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز، اندازه محصول PCR در همه گونه‌های بابزیا بین ۴۰۰-۳۸۰ جفت باز بود، در صورتی که در تیلریا سنگین تر و ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز بود.

۵. خالص سازی محصول PCR:

جهت انجام آزمایش Semi-Nested PCR، محصول PCR هایی که در مرحله قبل مثبت شده بودند با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (Purification Kit, MBST, Iran) بررسی و طبق دستور العمل شرکت سازنده خالص شدند. DNA تمیز و خالص شده حاصل از محصول PCR در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا جهت انجام Nested PCR-Semi در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

۶. بررسی حضور انگل تیلریا آنولاتابا استفاده از روش Semi-Nested PCR:

بدین منظور محصول تمامی نمونه‌هایی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمر های اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده ۱۸S rRNA مثبت شده بود، ابتدا با استفاده از کیت مخصوص خالص سازی محصول PCR، تخلیص و سپس با پرایمرهای اختصاصی Ta-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده ۱۸S rRNA تحت آزمایش PCR Semi-Nested قرار گرفتند. پس از انجام الکتروفورز، اندازه محصول Semi-Nested PCR در این مرحله ۱۹۳ جفت باز بود.

۷. بررسی حضور انگل تیلریا اورینتالیس با استفاده از روش Semi-Nested PCR:

بدین منظور محصول تمامی نمونه‌هایی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده ۱۸S rRNA مثبت شده بود، ابتدا با استفاده از کیت مخصوص خالص سازی محصول PCR، تخلیص و سپس با پرایمرهای اختصاصی To-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده ۱۸ S rRNA تحت آزمایش PCR Semi-Nested قرار گرفتند. پس از انجام الکتروفورز، اندازه محصول Semi-Nested PCR در این مرحله ۲۳۵ جفت باز بود.

۸. تعیین جنس و گونه کنه‌ها:

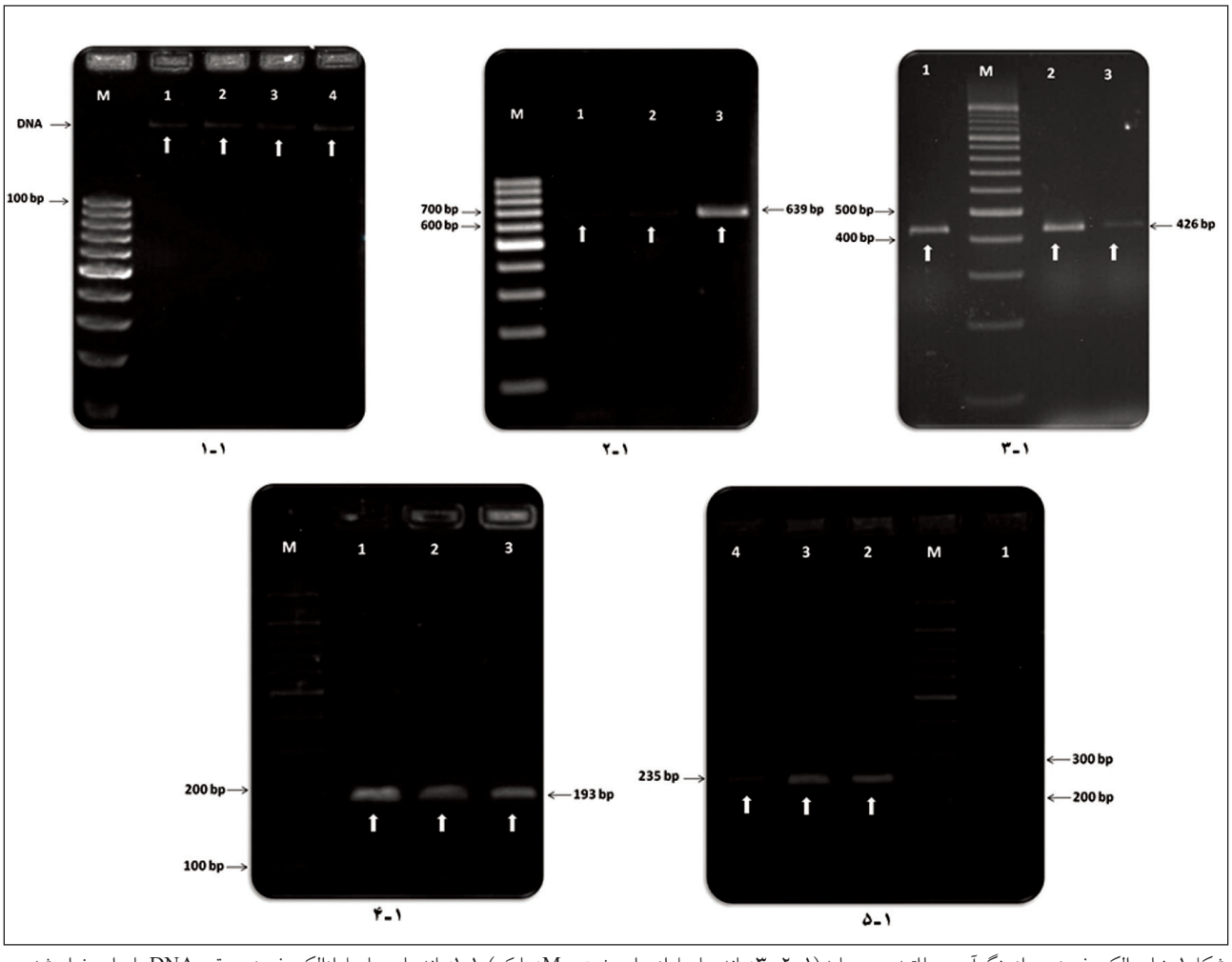
کلیه کنه های جمع آوری شده طی این پژوهش، در آزمایشگاه انگل شناسی تحت درشتنمایی استریومیکروسکوپ و بر اساس کلید تشخیص Estrada-Pen (۲۰۰۵) بر حسب جنس و گونه شناسایی شدند.

۹. آنالیز آماری نتایج:

در این مطالعه جهت آنالیز نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان و نیز آنالیز آماری نتایج موارد آلودگی بین گروه واکسینه و غیر واکسینه، بین گروه سم پاشی شده و سم پاشی نشده و بین گله‌های دارای سابقه بیماری تیلریوز و گله‌های فاقد سابقه این بیماری در استان از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای استفاده گردید و $p<0/05$ به منزله معنی دار بودن اختلاف و $p>0/05$ به منزله معنی دار نبودن اختلاف مورد پذیرش قرار می‌گرفت.

نتایج

نتایج ارزیابی مستقیم DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز در تمامی موارد مثبت بود. نتایج ارزیابی کلیه DNAهای استخراج شده با استفاده از پرایمر های اختصاصی Bba-S و Bba-A-



شکل ۱- نتایج الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ و ۲ و ۳: باند حاصل از موارد مثبت ـ M: مارکر). ۱-۱: باندهای حاصل ازالکتروفورز مستقیم DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۱-۲: باندهای حاصل ازالکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bba-S و Bba-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ۱-۳: باندهای حاصل ازالکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ۱-۴: باندهای حاصل ازالکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Ta-S و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ۱-۵: باندهای حاصل ازالکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی S-To و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد.

Bba تحت آزمایش PCR نیز در تمامی موارد مثبت بود (شکل ۱). آنالیز محصول PCR DNA|Bøای استخراج شده با استفاده از پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A نشان داد که از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۱۳ نمونه (۸/۱۲ درصد) آلوده به انگل تیلریا بودند، اما با هیچ نمونه مثبتی از انگل بابزیا طی این آزمایش برخورد نگردید. نتایج این مرحله بر اساس مناطق خشک و مرطوب و نیز نتایج تفکیکی براساس شهرستان مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. ارزیابی محصول PCR مرحله اول تحت آزمون Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا آنولاتانشان داد که از ۱۳ نمونه، تعداد ۱۲ مورد (۷/۵ درصد) آلوده به این انگل بودند. نتایج این مرحله براساس مناطق خشک و مرطوب و نیز نتایج تفکیکی بر اساس شهرستان مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. ارزیابی محصول PCR مرحله اول تحت آزمون Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا اورینتالیس نشان داد که از ۱۳ نمونه مورد بررسی، تعداد ۹ مورد (۵/۶۲ درصد) آلوده به این انگل می‌باشند. نتایج این مرحله بر اساس مناطق خشک و مرطوب و نیز نتایج تفکیکی بر اساس شهرستان مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. در این بررسی برای اولین بار تیلریا اورینتالیس با روش مولکولی در ایران گزارش می‌شود و ضمناً برای اولین بار آلودگی توام تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در ایران مطرح می‌گردد. در این بررسی ۲ گونه کنه از گاوهای مورد بررسی در استان گلستان جدا سازی گردید و از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی، ۷ نمونه (۴/۳۷ درصد) آلودگی به کنه داشتند. نتایج

جدول ۱- نام و مشخصات پرایمرها.

نام پرایمر	ژن	توالی نوکلئوتیدها ('3- '5)	ویژگی پرایمر
Bba-S	Bovine Beta-Actin	CCT-AGA-GAG-AAG-CGG-GGT-G-<G>	اختصاصی ژن بتا اکتین گاو
Bba-A	Bovine Beta-Actin	ATC-ACT-GCC-CTG-GCA-CCC-A-<G>	اختصاصی ژن بتا اکتین گاو
Tbs-S	18S rRNA	CAC-AGG-GAG-GTA-GTG-ACA-AG	اختصاصی جنس‌های تیلریا و بابزیا
Tbs-A	18S rRNA	CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA-G	اختصاصی جنس‌های تیلریا و بابزیا
Ta-S	18S rRNA	ACG-GAG-TTT-CTT-TGT-CTG-<A>	اختصاصی تیلریا آنولاتا
To-S	18S rRNA	ACA-TTT-CTC-TTG-TTT-GAG-<T>	اختصاصی تیلریا اورینتالیس

جدول ۲- نتایج تکثیر DNAهای استخراج شده از خون گاوهای استان گلستان به تفکیک مناطق و شهرستان‌ها (تعداد نمونه آلوده / درصد آلودگی).

نوع مناطق	شهرستان	تعداد نمونه	با پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A	با پرایمرهای Ta-S و Tbs-A	با پرایمرهای To-S و Tbs-A
مناطق خشک	گنبد کاووس	۲۰	۱(۵درصد)	۱(۵درصد)	۱(۵درصد)
	آق قلا	۲۰	۲(۱۰درصد)	۲(۱۰درصد)	۲(۱۰درصد)
	بندر ترکمن	۲۰	۶(۳۰درصد)	۵(۲۵درصد)	۴(۲۰درصد)
	کلاله	۲۰	۰	۰	۰
	کل شهرستان‌ها	۸۰	۹(۱۱/۲۵درصد)	۸(۱۰درصد)	۷(۸/۷۵درصد)
مناطق مرطوب	کردکوی	۲۰	۱(۵درصد)	۱(۵درصد)	۱(۵درصد)
	گرگان	۲۰	۲(۱۰درصد)	۲(۱۰درصد)	۱(۵درصد)
	بندرگز	۲۰	۱(۵درصد)	۱(۵درصد)	۰
	علی آباد کتول	۲۰	۰	۰	۰
	کل شهرستان‌ها	۸۰	۴(۵درصد)	۴(۵درصد)	۲(۲/۵درصد)

جدول ۳- وضعیت آلودگی به کنه‌ها در گاوهای استان گلستان.

نام علمی کنه	تعداد کنه جدا شده	تعداد کنه نر	تعداد کنه ماده	تعداد گاو آلوده
Rhipicephalus turanicus	۹	۲	۷	۴
Hyalomma marginatum	۵	۴	۱	۳

شناسایی کنه‌های جدا شده در این پژوهش در جدول ۳ آورده شده است. لازم به ذکر است که هیچ موردی از آلودگی با کنه‌ها از گاوهای آلوده با انگل تیلریا آنولاتایا تیلریا اورینتالیس جدا سازی نگردید. در این مطالعه موارد آلودگی با تیلریا آنولاتا با روش Semi-Nested PCR بر اساس وضعیت واکسیناسیون گله، وضعیت سم پاشی گله بر علیه انگل تیلریا آنولاتا و سابقه بیماری تیلریوز در گله در سال‌های گذشته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق گزارشات موجود، تاکنون دو گونه تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس از گاوهای ایران گزارش گردیده است که توسط کنه‌ها به گاو منتقل می‌شوند. تک یاخته تیلریا آنولاتا از سال ۱۳۱۴ در ایران مطرح بوده (۱۰) و عامل اصلی بیماری تیلریوز گاوی در ایران است. این تک یاخته می‌تواند سالانه خسارات زیادی را به صنعت دامپروری کشور وارد ساخته و قادر است بیماری حاد و کشنده‌ای را در گاوها ایجاد نماید. در نواحی که بیماری بصورت اندمیک در آمده است، آلودگی شدید بیشتر در نژادهای خالص و دورگ دیده می‌شود و گاوهای نژاد بومی از مقاومت بیشتری در برابر آن برخوردارند. کنه ناقل این تک یاخته نیز در اکثر نقاط ایران گونه‌های کنه هیالوما می‌باشند (۱). تک یاخته تیلریا اورینتالیس یکی از گونه‌های خوش خیم تیلریا است و در ایران برای اولین بار توسط یولینبرگ و هاشمی فشارکی از گاوهای شمال کشور و با روش IFAT گزارش گردید. آنها نشان دادند که این تک یاخته می‌تواند بصورت مرحله به مرحله توسط کنه همافیزالیس پونکتاتا انتقال یابد (۲۰). لازم به ذکر است بجز

جدول ۴- نتایج موارد آلودگی با تیلریا آنولاتا بر اساس وضعیت واکسیناسیون گله، وضعیت وضعیت سمپاشی گله، سابقه بیماری تیلریوز در گله در استان گلستان.

استان گلستان	تعداد نمونه	تعداد موارد آلودگی	فراوانی نسبی (٪)
موارد واکسینه	۱۳۵	۱۰	۷/۴۰
موارد غیر واکسینه	۲۵	۲	۸
موارد سمپاشی شده	۱۲۰	۱۰	۸/۳۳
موارد سمپاشی نشده	۴۰	۲	۵
موارد سابقه دار	۱۰	۱	۱۰
موارد بدون سابقه	۱۵۰	۱۱	۷/۳۳

گزارش یولینبرگ و هاشمی فشارکی، گزارش دیگری از حضور تک یاخته تیلریا اورینتالیس در ایران وجود ندارد، اما با استفاده از روش طراحی شده در این تحقیق، برای اولین بار با تکنیک مولکولی semi-nested PCR، تیلریا اورینتالیس از گاوهای ایران جداسازی گردید (۶). تاکنون مطالعات متعددی بر روی تیلریاها با روش های تشخیصی متفاوت در ایران و جهان صورت پذیرفته است که می توان به روش تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی با گیمسا، روش های سرولوژی و نیز روش های مولکولی در سال های اخیر اشاره کرد. امروزه روش های مولکولی بعلت دارا بودن حساسیت و ویژگی بالا نسبت به روش های سنتی نظیر روش های میکروسکوپی و سرولوژیک، در مطالعات اپیدمیولوژیک تیلریوز گاوی و گوسفندی مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند (۱۳). روش PCR یکی از روش های مولکولی بوده که از حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص تیلریا برخوردار است، بطوری که قادر به شناسایی ۳-۲ پیروپلاسم تیلریا آنولاتا در هر میکرولیتر خون گاو می باشد (۱۵). استفاده از PCR در تشخیص گونه های تیلریا در مقایسه با مشاهده میکروسکوپی گسترش های خونی، به طور مشخص نتایج بهتری دارد و حتی می تواند گونه های پاتوژن و غیر پاتوژن تیلریا را از هم تفکیک کند، در حالی که این امر غالباً در تشخیص میکروسکوپی امکان پذیر نیست. علاوه بر آن PCR در تشخیص آلودگی به گونه های بابزیا نیز در مقایسه با مشاهده میکروسکوپی، به طور مشخص قدرت تشخیصی بالاتری دارد. بنابر این روش PCR یک روش ایده آل برای تشخیص و تمایز پیروپلاسم ها می باشد (۱۲). در مطالعه ای در ایران، عزیزی و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی، ۱۴۰ نمونه خون تهیه شده از گاوهای بومی را با روش های PCR و میکروسکوپی از نظر آلودگی به انگل تیلریا آنولاتا مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی نیز بین نتایج روش میکروسکوپی و روش PCR اختلاف وجود داشت بطوریکه نرخ حاملین انگل تیلریا آنولاتا به ترتیب ۸/۱ درصد و ۴۰ درصد تعیین گردید (۱۴). مطابق با نظر سایر محققین (۱۷و۱۶،۱۵،۱۲،۱۱)، اگرچه روش گیمسا یک تکنیک ساده و سریع در تشخیص تیلریوز گاوی در فرم حاد و همراه با علائم آن می باشد، اما این روش برای تعیین مخازن این انگل و نیز در فرم مزمن این آلودگی مناسب نبوده و روش های سرولوژی نیز نسبت به روش های مولکولی از حساسیت و ویژگی پایین تری برخوردارند. به همین دلیل در بررسی حاضر استفاده از تکنیک مولکولی PCR و Semi-Nested PCR مورد توجه و استفاده قرار گرفته است. شایان و رهبری نشان دادند که با استفاده از روش های مولکولی می توان به طور همزمان گونه های تیلریا و بابزیا را از یکدیگر متمایز نمود (۱۹ و ۱۸). در بررسی حاضر، بدلیل احتمال حضور آلودگی های بابزیایی در گاوها و ایجاد اشکال در تشخیص آن از آلودگی های تیلریایی، پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A مشتق شده از ژن S rRNA۱۸ با قابلیت تمایز تمامی گونه های تیلریا و بابزیا طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. نتایج PCR روی DNAهای استخراج شده با استفاده از پرایمرهای فوق و ارزیابی محصول آن با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد که تمامی موارد مثبت واجد آلودگی تیلریایی بوده و با هیچگونه آلودگی بابزیایی در این بررسی برخورد نشد. ارزیابی نتایج این مرحله نشان داد که تعداد ۱۳ نمونه (۸/۱۲ درصد) از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی در استان گلستان واجد آلودگی تیلریایی هستند. با در نظر گرفتن نظر کارشناسان دامپزشکی استان گلستان مبنی بر بالاتر بودن میزان آلودگی در مناطق خشک استان نسبت به مناطق مرطوب و در ارزیابی نتایج این بررسی بر حسب مناطق، اگرچه فراوانی نسبی آلودگی تیلریایی در مناطق خشک استان (۱۱/۲۵ درصد) نسبت به مناطق مرطوب (۵درصد) بیشتر بوده است، اما در آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، اختلاف معنی داری بین نتایج این دو منطقه بدست نیامد. همچنین در ارزیابی نتایج این مرحله به تفکیک شهرستان مورد بررسی، فراوانی نسبی آلودگی به تیلریاها در شهرستان بندر ترکمن ۳۰ درصد، در شهرستان های گرگان و آق قلا ۱۰ درصد، در شهرستان های گنبد کاووس، بندرگز و کردکوی ۵ درصد بود و هیچگونه آلودگی تیلریایی در

نمونه‌های آزمایش شده از شهرستان‌های کلاله و علی آباد کتول مشاهده نگردید. بنابراین مشخص گردید که بالاتر بودن فراوانی نسبی آلودگی در نمونه‌های مناطق خشک استان بدلیل فراوانی نسبی بالاتر آلودگی در نمونه‌های اخذ شده از شهرستان بندر ترکمن بوده است. در روش Nested PCR از دو پرایمر داخلی تر و در روش Semi-Nested PCR از یک پرایمر داخلی تر نسبت به محصول PCR اول استفاده می‌شود . در واقع محصول PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای PCR دوم عمل می‌کند. اندازه محصول این واکنش در مقایسه با واکنش اول کوچکتر است. طبق محاسبات صورت گرفته این روش باعث افزایش حساسیت تشخیص محصول صحیح به میزان 10^4 برابر می‌گردد. حتی اگر محصول PCR مرحله اول در بین پس زمینه محصولات غیر اختصاصی محو شده باشد، با استفاده از پرایمرهای داخلی، امکان تکثیر موثر و اختصاصی را خواهد داشت. از طرف دیگر احتمال اینکه محصولات PCR غیر اختصاصی، توالی‌های مشابه پرایمرهای داخلی را داشته باشند بسیار کم است و به همین دلیل معمولاً پس از انجام PCR Nested نباید محصولات غیر اختصاصی وجود داشته باشند (۷). حساسیت Nested PCR بسیار بالاتر از روش PCR معمولی است. علاوه بر آن اختصاصیت Nested PCR نیز به علت وجود پرایمرهای داخلی بالاتر از روش PCR معمولی است و از آنجائی که در Nested PCR محصول بدست آمده از واکنش اول به لوله جدیدی منتقل می‌شود، لذا در صورت وجود ممانعت‌هایی برای PCR، غلظت آنها کاهش می‌یابد (۵). در مرحله دیگری از بررسی حاضر یک پرایمر Sense داخلی تر نسبت به پرایمرهای قبلی و اختصاصی برای انگل تیلریا آنولاتا طراحی گردید و با پرایمر Anti Sense قبلی مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR موارد مثبت مرحله قبل پس از خالص سازی با استفاده از کیت مخصوص، با پرایمرهای مذکور یعنی پرایمرهای Ta-S و Tbs-A تحت آزمون PCR Semi-Nested قرار گرفتند. آنالیز محصولات این مرحله با الکتروفورز بر روی ژل آگارز نشان داد که تعداد ۱۲ مورد از ۱۳ نمونه مثبت مرحله قبل آلوده به انگل تیلریا آنولاتا هستند و فقط در یک مورد باندی مشاهده نگردید. بنابراین نتایج Nested PCR-Semi با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا آنولاتا نشان داد که تعداد ۱۲ نمونه (۷/۵ درصد) از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی در استان گلستان آلوده به انگل تیلریا آنولاتا هستند . در ارزیابی این نتایج Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا آنولاتا بر حسب مناطق، اگرچه باز هم فراوانی نسبی آلودگی به انگل تیلریا آنولاتا در مناطق خشک استان (۱۰ درصد) بیشتر از مناطق مرطوب (۵ درصد) بوده است، اما در آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، اختلاف معنی‌داری بین این دو منطقه بدست نیامد . همچنین در ارزیابی نتایج این مرحله به تفکیک شهرستان مورد بررسی، فراوانی نسبی آلودگی به انگل تیلریا آنولاتا در شهرستان بندر ترکمن ۲۵ درصد، در شهرستان‌های گرگان و آق قلا ۱۰ درصد و در شهرستان‌های گنبد کاووس، بندرگز و کردکوی ۵ درصد بوده و در نمونه‌های آزمایش شده از شهرستان‌های کلاله و علی آباد کتول هیچگونه آلودگی به انگل تیلریا آنولاتا مشاهده نگردید . بنابر این مشخص گردید که بالاتر بودن فراوانی نسبی آلودگی به تیلریا آنولاتا در نمونه‌های مناطق خشک استان بدلیل فراوانی نسبی بالاتر آلودگی در نمونه‌های اخذ شده از شهرستان بندر ترکمن بوده است. در ادامه کار این مطالعه، به دلیل اینکه در یک نمونه اخذ شده از شهرستان بندر ترکمن، آلودگی با جنس تیلریا در PCR اولیه تایید گردید، اما با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا آنولاتا در آزمون Semi-Nested PCR تکثیر نشد، لذا احتمال حضور گونه دیگری از تیلریا غیر از تیلریا آنولاتا در نمونه مذکور دور از انتظار نبود . بنابراین با توجه به تنها گزارش موجود از انگل تیلریا اورینتالیس در ایران که توسط یولینبرگ و هاشمی فشارکی در سال ۱۹۸۴ که برای اولین بار آن را از گاوهای شمال کشور گزارش نمودند، اصلی ترین احتمال در خصوص گونه تیلریای مذکور، تیلریا اورینتالیس بود(۲۰). بنابراین با طراحی یک پرایمر اختصاصی برای انگل تیلریا اورینتالیس، نمونه مورد نظر را از نظر آلودگی به این انگل مورد بررسی قرار دادیم و همانگونه که انتظار می‌رفت، نتایج بررسی نمونه فوق با پرایمرهای To-S و Tbs-A در آزمون PCR Semi-Nested آلودگی به انگل تیلریا اورینتالیس را نشان داد. با توجه به تایید وجود آلودگی به انگل تیلریا اورینتالیس در یکی از نمونه‌ها، مقرر شد تا حضور این انگل در سایر نمونه‌های تهیه شده از گاوهای استان گلستان نیز بررسی شود. بنابراین تمامی ۱۳ نمونه‌ای که PCR آنها در مرحله اول مثبت شده بود با پرایمرهای To-S و Tbs-A تحت آزمایش Semi-Nested PCR قرار گرفتند . نتایج آنالیز محصولات این مرحله با الکتروفورز و بر روی ژل آگارز نتایج جالبی را نشان داد. نتایج Nested PCR-

Semi با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلریا اورینتالیس نشان داد که تعداد ۹ نمونه (۵/۶۲ درصد) از ۱۶۰ نمونه مورد بررسی در استان گلستان آلوده به انگل تیلریا اورینتالیس هستند. در ارزیابی این نتایج بر حسب مناطق، میزان آلودگی تیلریایی در مناطق خشک و مرطوب استان به ترتیب ۸/۷۵ درصد (۷ مورد از ۸۰ نمونه) و ۲/۵ درصد (۲ مورد از ۸۰ نمونه) تعیین گردید. اما در آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای، اختلاف معنی داری بین این دو منطقه بدست نیامد. همچنین در ارزیابی نتایج این مرحله به تفکیک شهرستان مورد بررسی، میزان آلودگی به تیلریا اورینتالیس در شهرستان بندر ترکمن ۲۰ درصد، در شهرستان آق قلا ۱۰ درصد، در شهرستان های گنبد کاووس، گرگان و کردکوی ۵ درصد بوده و در نمونه های آزمایش شده از شهرستان های کلاله، بندر گز و علی آباد کتول هیچگونه آلودگی به انگل تیلریا اورینتالیس مشاهده نگردید. با مقایسه نتایج بدست آمده از آزمون Semi-Nested PCR برای تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مشخص گردید که بالاترین فراوانی نسبی آلودگی در مورد هر دو انگل مربوط به مناطق خشک استان و نیز شهرستان بندر ترکمن در این منطقه بوده است. بنابر آنچه شرح آن در بالا آورده شد و با توجه به اینکه تنها گزارش موجود از انگل تیلریا اورینتالیس در ایران با بررسی های سرولوژیکی و مورفولوژیکی بوده است (۲۰). لذا در پژوهش حاضر، تیلریا اورینتالیس برای اولین بار با روش مولکولی در ایران گزارش می شود. ضمناً آلودگی توام دو گونه تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس نیز در گاوهای ایران مطرح می گردد، چراکه در ۸ مورد از نمونه های مورد بررسی، این آلودگی توام دیده شده است. لازم به ذکر است اگرچه موارد آلودگی به تیلریا آنولاتا در گروه های غیر واکسینه، سمپاشی نشده و با سابقه قبلی بیماری تیلریوز در گله به ترتیب بیشتر از موارد آلودگی در گروه های واکسینه، سمپاشی شده و فاقد سابقه قبلی بیماری تیلریوز در گله بوده است، اما آنالیز آماری نتایج، ارتباط معنی داری را بین میزان آلودگی با وضعیت واکسیناسیون، وضعیت سمپاشی و سابقه قبلی بیماری تیلریوز در گله نشان نداد. در این بررسی کنه های *Hyalomma marginatum* و *Rhipicephalus turanicus* از ۴/۳۷ درصد گاوهای مورد بررسی جداسازی شدند که جنس کنه های مذکور با کنه های جداسازی شده در مطالعه بهادری و همکاران در استان همخوانی دارد، اگرچه در مطالعه اخیر گونه کنه ها تعیین نشده است (۴).

منابع

۱. سخا، م.، رادفر، م.، جانباز، م. (۱۳۸۰) مطالعه و بررسی گاوهای مبتلا به تیلریوز ارجاعی به درمانگاه اداره دامپزشکی گناباد طی نیمسال اول ۱۳۷۷، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، (۲)۲، صفحه ۱۸۷- ۱۹۲.

۲. حبیبی، غ.، هاشمی فشارکی، ر.، اسماعیل نیا، ک.، بزرگی، ص.، بردبار، ن. (۱۳۸۴) مقایسه دو روش IFAT و PCR در تشخیص و شناسایی تک یاخته‌های *Babesia bovis*، *Theileria annulata* و *Theileria lestoquardi*، مقالات چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، صفحه ۴.

۳. خواجه، غ.، حاجی کلایی، م.، راضی جلالی، م.، راسخ، ع.، علوی، ن. (۱۳۸۴) مطالعه برخی پارامترهای الکترولیتی و غیر الکترولیتی سرم خون گاوهای مبتلا به *Theileria annulata*، مجله پژوهش و سازندگی، ۶۶، صفحه ۴۶- ۵۲.

۴. رنجبر بهادری، ش.، اسلامی، ع.، آقا ابراهیمی سامانی، ر. (۱۳۸۶) بررسی آلودگی های انگلی نشخوار کنندگان بومی استان گلستان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۵)۶۲، صفحه ۳۰۳- ۳۰۵.

۵. شاه حسینی، م.، تهرانی، س. (۱۳۸۰) واکنش زنجیره ای پلیمراز، انتشارات پارسیان، صفحه ۱- ۵۶.

۶. قائمی، پ. (۱۳۸۹) تعیین میزان آلودگی به انگل تیلریا آنولاتا در گاوهای مخزن و کنه های ناقل در دامداری های سنتی استان گلستان، پایان نامه دوره دکترای تخصصی انگل شناسی و بیماری های انگلی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحه ۸۵- ۹۹.

۷. کریمی، م.، زینلی، س. (۱۳۸۳) مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی PCR، انتشارات اندیشه ظهور، صفحه ۳۸۰.

۸. کیابی، ب.، قائمی، ر.، عبدلی، ا. (۱۳۷۸) اکوسیستم‌های تالابی و رودخانه ای استان گلستان، انتشارات اداره کل حفاظت محیط زیست استان گلستان، صفحه ۱- ۷

۹. مرشدی، ا.، حریدالهی، م.، توسلی، م.، دلیرنقده، ب. (۱۳۸۲) بررسی سرم شناسی عفونت ناشی از تیلریا آنولاتا در گاو

به روش الایزا و مقایسه آن با مشاهدات بالینی و ریزبینی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۴)۵۸، صفحه ۳۱۹-۳۲۲.

۱۰.مظفری، ع.، نور اللهی فر، س.، محمدی، و. (۱۳۸۶) بررسی فراوانی تیلریوز گاوی در گاوداری‌های شهرستان زاهدان، مجله دامپزشکی ایران، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳(۳)، صفحه ۶۷-۷۰.

11. Aktas, M., Dumanli, N., Cetinkaya, B., Cakmak, A. (2002) Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey. *Veterinary Record*, **150(17)**: 548-549.
12. Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Ortuno, A., Estrada-Pena, A., Gutierrez, J. F. (2001) Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Veterinary Parasitology*, **99(3)**: 249-259.
13. Altay, K., Dumanli, N., Holman, P. J., Aktas, M. (2005) Detection of *Theileria ovis* infected sheep by Nested PCR. *Veterinary Parasitology*, **127**: 99-104.
14. Azizi, H., Shiran, B., Farzaneh-Dehkordi, A., Salehi, F., Taghadosi, C. (2008) Detection of *Theileria annulata* by PCR and its comparision with smear method in native carrier cows. *Biotehnology*, **7(3)**: 574-577.
15. D'oliveira, C., Van der Weide, M., Habela, M., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1995) Detetion of *Theileria annulata* in blood samples of carrier Cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33(10)**: 2665-2669.
16. Mahmmod, Y. S., El-Balkemy, F. A., Yuan, Z. G., El-Mekkawy, M. F., Monazie, A. M., Zhu, X. Q. (2010) Field Evaluation of PCR Assays for the Diagnosis of Tropical Theileriosis in Cattle and Water Buffaloes in Egypt. *Jounal of Animal and Veterinary Advances*, **9(4)**: 696-699.
17. Roy, K. C., Ray, D., Bansal, G. C., Singh, R. K. (2000) Detection of *Theileria annulata* carrier cattle by PCR. *Indian Journal of Experimental Biology*, **38(3)**: 283-284.
18. Shayan, P., Rahbari, S. (2005) Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. *Parasitology Research*, **97**: 281-286.
19. Shayan, P., Rahbari, S. (2007) Differntiation of sheep *Theileria* spp. and *Babesia* spp. by polymerase chain Reaction, *Journal of Veterinary Research*, **62(2)**: 15-20.
20. Uilenberg, G., Hashemi-Fesharaki, R. (1984) *Theileria orientalis* in Iran. *Veterinary Q Journal*, **6(1)**: 1-4.