

“Research article”

DOI: 10.30495/JVCP.2019.664881

Detection of *Theileria orientalis* infection in indigenous buffaloes of West Azarbaijan province using molecular and microscopic tests

Narimani, B.^{1*}, Hoghooghi-Rad, N.², Shayan, P.³, Rahbari, S.², Esmail-Nia, K.⁴

- 1- D.V.Sc. Graduate, Department of Microbiology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- 2- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
- 3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
- 4- Professor, Department of Parasite Vaccine Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREEO, Karaj, Iran.

*Corresponding author's email: narimani.b@gmail.com

(Received: 2017/10/7 Accepted: 2019/4/8)

Abstract

The causative agent of bovine theileriosis is obligatory intracellular protozoa called *T. annulata* which results in severe anemia, severe pulmonary edema and rapid death in non-native animals. The present study was aimed to detect the current state of *Theileria* infection in indigenous buffaloes and its association with environmental factors in four cities of West Azarbaijan province using microscopic tests (blood smear evaluation) and molecular assays. Blood samples were randomly collected from 291 buffaloes in the region, during March to July 2014. Direct and semi-nested PCR techniques were used to detect DNA of *Theileria* spp. using specific pair primer 18SrRNA. In the microscopic assay method, presence of this parasite in four (1.37%) buffaloes was approved. The molecular assays revealed that 4 out of 291 animals (1.37%) were infected by *T. annulata*. Also the present study showed that two female adult buffaloes (0.68%) were simultaneously infected by *T. annulata* and *T. orientalis*. Apparent and real prevalence of infection of buffaloes to *T. annulata* in the molecular method were 1.37 and 1 percent respectively. The chance of infection by *T. annulata* and *T. orientalis* were equal. Molecular prevalence of *T. annulata* in Urmia and Salmas were 2.2 and 2.3 percent respectively ($p<0.05$). Molecular prevalence of *T. orientalis* in Urmia was 2.2%. This is the first study to indicate the presence of infection with *T. orientalis* in indigenous buffaloes of Urmia city in Iran.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Theileria orientalis*, Buffalo, Microscopic examination, Molecular detection, West Azarbaijan.

تشخیص آلودگی گاو میش‌های بومی به تیلریا اوریتالیس در استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های مولکولی و میکروسکوپی

بابک نریمانی^۱، ناصر حقوقی راد^{۲*}، پرویز شایان^۳، صادق رهبری^۲، کسری اسمعیل‌نیا^۴

۱- دانش‌آموخته دکترای دستیاری، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، تهران، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- استاد بخش تحقیق و تولید واکسن انگلی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: hoghooghirad@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۷/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۱/۱۹)

چکیده

عامل ایجادکننده بیماری تیلریوز در گاوها، انگل تک‌یاخته‌ای خونی داخل سلولی اجباری به نام تیلریا آنولاتا بوده که باعث کم‌خونی شدید، خیز شدید ریه‌ها و به‌خصوص در دام‌های غیربومی موجب مرگ سریع می‌شود. هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاو میش‌های بومی و ارتباط آن با عوامل محیطی در چهار شهر استان آذربایجان غربی با روش‌های میکروسکوپی و مولکولی بود. به‌طور تصادفی ۲۹۱ نمونه خون از گاو میش‌های منطقه از اسفند ۱۳۹۲ تا تیر ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. روش‌های PCR مستقیم و semi-nested PCR نیز برای ارزیابی DNA گونه‌های انگل تیلریا با استفاده از جفت پرایمرهای ویژه جزء rRNA-18S مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی میکروسکوپی، حضور این انگل در ۴ رأس گاو میش (۱/۳۷ درصد از گاو میش‌های مورد آزمایش) تأیید گردید. بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که نمونه‌های خون در ۴ مورد از ۲۹۱ رأس گاو میش (۱/۳۷ درصد از موارد) به انگل تیلریا آنولاتا (*Theileria annulata*) آلوده بودند. همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس گاو میش ماده بالغ (۰/۶۸ درصد از گاو میش‌های مورد آزمایش) به‌طور هم‌زمان به گونه تیلریا اوریتالیس (*Theileria orientalis*) هم آلوده بوده‌اند. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی گاو میش به تیلریا آنولاتا در روش مولکولی به ترتیب ۱/۳۷ و ۱ درصد به‌دست آمد. شانس آلودگی به گونه‌های تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس برابر بود. شیوع مولکولی تیلریا آنولاتا در شهرهای ارومیه و سلماس به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($p < 0/05$). شیوع مولکولی تیلریا اوریتالیس در شهر ارومیه ۲/۲ درصد برآورد شد. این مطالعه برای اولین بار تأیید کرد که انگل تیلریا اوریتالیس در گاو میش‌های بومی شهر ارومیه ایران وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: تیلریا اوریتالیس، گاو میش، آزمایش میکروسکوپی، تشخیص مولکولی، آذربایجان غربی.

مقدمه

سپس مرزوییت های آزاد در سیتوپلاسم تبدیل به پیروپلاسم می گردند. از طرف دیگر سلول هایی در گردش خون محیطی و طحال نیز وجود دارند که می توانند تکثیر انگل را در داخل لنفوسیت، محدود کنند و یا حتی سلول های هدف را از بین ببرند (Ahmad and Melhorn, 1999; Bishop *et al.*, 2004; Shaw, 2002; Striepen *et al.*, 2007). باید توجه گردد که روش تشخیص انتخابی انگل مذکور فقط در مرحله ابتدای بیماری، تهیه گسترش از عقده لنفاوی و مشاهده آن به وسیله میکروسکوپ نوری می باشد. اما گزارش شده که استفاده از روش PCR در نمونه خون، می تواند آلودگی را در مرحله مزمن نیز مشخص کند، حتی اگر همان دام ها با استفاده از روش PCR بر روی نمونه های عقده های لنفاوی، از نظر آلودگی مذکور، منفی تشخیص داده شوند (Ahmad and Melhorn, 1999).

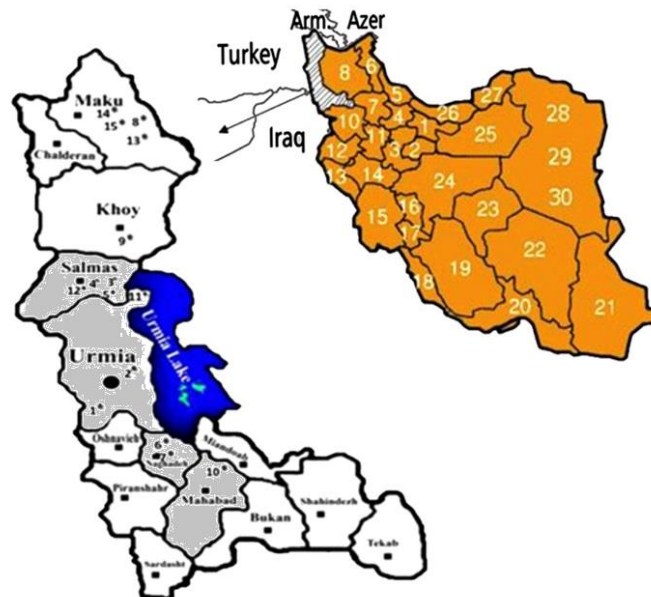
هفت گونه از انگل جنس تیلریا می توانند خانواده گاوان را آلوده کنند که از بین آنها تیلریا پاروا، تیلریا آنولاتا و تیلریا ولیفرا در گاو میش معمولاً ایجاد علائم بیماری می کنند. البته بیماری ایجاد شده توسط تیلریا اوریتتالیس از لحاظ درمانگاهی اغلب ملایم و یا کم علامت می باشد (Hoseini *et al.*, 2003) (جدول ۱). شکل اسپوروزوایت انگل تیلریا، عقده لنفاوی مجاور محل خونخواری را آلوده می کند و در سیتوپلاسم سلول های لنفاوی مستقر می گردد. اسپوروزوایت ها با تکثیر به روش شیزوگونی، شیزونت هایی (موسوم به اجسام آبی کخ) ایجاد می کنند. این شیزونت ها تبدیل به مرزوییت های چند هسته ای شده و مروگونی باعث پارگی لنفوسیت و رهایی مرزوییت ها از آن و نفوذ به گلبول های قرمز می شود.

جدول ۱- گونه های انگل تیلریا که در گاو میش ایجاد آلودگی می کنند

میزبان	ناقل بندپای احتمالی در ایران	بیماری زایی	پراکندگی	گونه
گاو میش	هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم هیالوما مارژیناتوم مارژیناتوم هیالوما مارژیناتوم تورانیکوم هیالوما دتریتوم	تیلریوز گرمسیری، تب ساحل مدیترانه ای، تب مصری	شمال آفریقا، جنوب اروپا، خاورمیانه، هند و جنوب شوروی سابق	تیلریا آنولاتا
گاو میش	ریپی سفالوس آپندیکولاتوس ریپی سفالوس زمبزیسیس	تب ساحل شرقی آفریقا، کوریدور گاو، ژانویه زمبابوه، تب کنه ای رودزایی	شمال شرق و مرکز آفریقا	تیلریا پاروا
گاو میش	آمبلیوما وارینگاتوم همافیزالیس پونکتاتا همافیزالیس سینابارینا	تیلریوز به ظاهر خوش خیم	صحرای جنوب آفریقا و جزایر کاراییب	تیلریا ولیفرا
گاو میش	همافیزالیس ژاپنیکوم همافیزالیس کومسینا همافیزالیس هومروسال	تیلریوز	استرالیا، آفریقا، ایالات متحده، آسیا و اروپا	تیلریا اوریتتالیس

نخجوان و ارمستان ۱۳۵ کیلومتر است. فاصله شهر ارومیه تا مرز سرو (مرز ترکیه) هم حدود ۵۵ کیلومتر می‌باشد (شکل ۱).

استان آذربایجان غربی از نظر شرایط جوی دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های معتدل می‌باشد و تحت تأثیر اقلیم نیمه‌مدیترانه‌ای است. طول مرز این استان با کشورهای ترکیه ۴۸۸ کیلومتر، عراق ۲۰۰ کیلومتر،



شکل ۱- نقشه استان آذربایجان غربی در تقسیمات کشوری و شهرهای مورد مطالعه

آذربایجان غربی (مه‌باد، نقده، ارومیه و سلماس) با روش‌های میکروسکوپی (بررسی گسترش خونی) و مولکولی (استفاده از روش PCR) بود.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری: نظر به این که آلودگی گاومیش‌ها نامشخص بود و از طرف دیگر با در نظر داشتن مقاومت طبیعی گاومیش‌ها در مقابل اغلب بیماری‌های انگلی، تصمیم گرفته شد از احتمال یک درصد آلودگی استفاده شود. بنابراین برای تعیین تعداد نمونه‌های مورد

در سال ۱۳۹۴ در ارومیه مطالعه‌ای روی ۱۳۸ رأس گاومیش از نظر آلودگی به تیلریا صورت گرفت (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016) که نتایج آزمایشات میکروسکوپی و مولکولی ایشان نشان داد که دام‌های مذکور از نظر آلودگی به انگل گونه تیلریا آنولاتا مثبت ولی از نظر آلودگی به گونه تیلریا اوریتتالیس منفی بودند. بررسی‌ها نشان داد که به غیر از این تحقیق، مطالعه دیگری در ایران بر وجود آلودگی به انگل تیلریا در گاومیش‌ها صورت نگرفته است. لذا هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاومیش‌های بومی به گونه‌های انگل مذکور در چهار شهر بزرگ استان

آزمایش در استان آذربایجان غربی با درجه اطمینان ۹۵ درصد و خطای مطلق ۵ درصد، در خصوص مجموع تقریبی ۴۰ هزار رأس گاومیش بومی موجود در منطقه، محاسبات لازم صورت گرفت (Thrusfield, 2005) و با همکاری شبکه‌های دامپزشکی و با استفاده از یک پرسش‌نامه از اسفند ماه سال ۱۳۹۲ تا تیرماه سال ۱۳۹۳ از تعداد ۲۹۱ رأس گاومیش شامل: ۱۹۴ رأس (۶۷ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نر و ۹۷ رأس (۳۳ درصد از دام‌های مورد آزمایش) ماده، از ۴ شهر استان شامل مهاباد، نقده، ارومیه و سلماس نمونه‌برداری شد.

از این تعداد، ۲۱۰ رأس (۷۲ درصد از دام‌های مورد آزمایش) بالغ و ۸۱ رأس (۲۸ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نابالغ با ظاهر سالم و دارای سن ۶ ماه تا ۱۰ سال، ۷۳ رأس از مهاباد، ۷۳ رأس از نقده، ۷۲ رأس از ارومیه و ۷۳ رأس از سلماس به صورت تصادفی انتخاب شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد نیاز برای انجام مطالعه حاضر، از گاومیش‌هایی اخذ شدند که منحصراً در همان استان تولد یافته و نگه‌داری می‌گردیدند.

برای انجام آزمایشات، از هر رأس دام، پنج میلی‌لیتر نمونه خون وریدی محیطی، پس از ضدعفونی کردن محل، اخذ گردیده و بلافاصله دو گسترش نازک با استفاده از لام‌های شیشه‌ای از هر نمونه خون تهیه می‌شد. سپس با ریختن متانول خالص (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ, USA) روی گسترش‌های خشک‌شده و گذشت پنج دقیقه، گسترش‌ها تثبیت می‌گردید. همزمان و سریعاً باقی‌مانده هر نمونه در لوله شیشه‌ای ونوجکت (venoject) تمیز ریخته شده و هم حجم آن اتانول (MERCK & Co.,

مطالعه میکروسکوپی: گسترش‌های خونی بعد از تثبیت با متانول به مدت ۴۵ دقیقه با محلول گیمسای ۵ درصد در بافر فسفات سالیین پوشانده شدند (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016). مشاهده شکل پیروپلاسمی (piroplasm) انگل تیلریا در داخل گلبول‌های قرمز موجود در گسترش‌های تهیه‌شده، به عنوان مثبت بودن آلودگی و عدم مشاهده آن‌ها در ۱۰۰ «میدان دید» میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی بالا (۱۰۰۰×) در هر گسترش به عنوان منفی بودن آلودگی، تلقی می‌گردید (Aktas et al., 2006). از آنجا که تفکیک گونه‌ها با میکروسکوپ معمولی، تشخیصی قطعی نمی‌باشد، به همین دلیل از روش مولکولی نیز استفاده گردید (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

مطالعه مولکولی: استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از مجموعه ابزار و مواد کیت استخراج ساخت مؤسسه (PCR Purification Kit, MBST; Iran) طبق دستور عمل شرکت سازنده انجام گرفت. این روش بر اساس اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیسی حامل تعبیه‌شده در ستون پلاستیکی spin ساخت مؤسسه مذکور عمل می‌کند. به طور خلاصه، ابتدا مقدار بسیار کمی از لخته خون کامل با قاشقک تمیز برداشته شده و در داخل دیواره یک میکروتیوب اپندورف (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) تمیز ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده می‌شد. این لوله‌های اپندورف به مدت یک شب در دمای اتاق (با در باز) به دور از هر آلودگی نگه داشته می‌شدند تا کاملاً خشک و بدون چسبندگی و البته

PCR (Station, NJ; USA) ۱/۵ درصد، الکتروفورز (Purification Kit, MBST; Iran) گردیده و کیفیت آن مورد بررسی قرار می‌گرفت (Shayan and Rahbari, 2005).

- انجام PCR و Nested-PCR: طراحی پرایمرها: گام اول در انجام آزمایش PCR، طراحی پرایمرهای مناسب جهت تکثیر ژن مورد نظر است. پرایمرها اولیگونوکلوئوتیدهای تک رشته‌ای هستند که مکمل قسمتی از DNA بوده و به رشته DNA الگو متصل می‌شوند. آنزیم DNA پلی‌مراز در امتداد آغازگر، از سمت پایانه 5' رشته DNA الگو، مکمل رشته الگو را سنتز می‌کند (Hoghooghi-Rad et al., 2011) (جدول ۲).

در ابتدا جهت ارزیابی و اطمینان از قابلیت عملی DNA، هر یک از نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی P1 و P2 مشتق‌شده از ژن کدکننده پروتئین بتا‌اکتین (CinnaGen, Tehran; Iran) مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۲).

عاری از الکل گردند. در روز بعد، نمونه‌ها در حضور آنزیم پروتئیناز K در دمای ۵۵ درجه سلسیوس با افزودن ۱۸۰ میکرولیتر بافر لایزس (lysis buffer)، به محلولی کاملاً یکنواخت تبدیل می‌شدند. سپس با افزودن ۳۶۰ میکرولیتر بافر بایندینگ (binding buffer) به هر نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در معرض حرارت مرطوب ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده می‌شدند. در ادامه ۲۷۰ میکرولیتر اتانول مطلق (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA) به لوله حاوی نمونه افزوده و محلول حاصله به ستون spin منتقل می‌شد. محتوای ستون، دو بار با بافر شستشو در سانتریفیوژی (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) با ۸۰۰۰ دور در دقیقه تصفیه می‌گردید. سپس با استفاده از بافر الوسیون (elution buffer) DNA استخراج‌شده از هر نمونه به‌طور جداگانه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به حالت منجمد نگه‌داری می‌شد. در نهایت DNA استخراجی از هر نمونه روی ژل آگارز (MERCK & Co., INC., Whitehouse

جدول ۲- نام و مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده

نام پرایمر	ژن هدف	ترتیب نوکلئوتیدی پرایمرها (۳-۵)	ویژگی
Bba-S (P1)	بتا‌اکتین گاوی	CCT-AGA-GAG-AAG-CGG-GGT-G-<G>	جهت تکثیر ژن رمزگشای بتا‌اکتین گاوی
Bba-A (P2)	بتا‌اکتین گاوی	ATC-ACT-GCC-CTG-GCA-CCC-A-<G>	جهت تکثیر ژن رمزگشای بتا‌اکتین گاوی
Tbs-S (P3)	18S rRNA	CAC-AGG-GAG-GTA-GTG-ACA-AG	ویژه گونه‌های تیلریا و گونه‌های بابریا
Tbs-A (P4)	18S rRNA	CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA-G	ویژه گونه‌های تیلریا و گونه‌های بابریا
Ta-S (P5)	18S rRNA	ACG-GAG-TTT-CTT-TGT-CTG-<A>	ویژه تیلریا آنولاتا
To-S (P6)	18S rRNA	ACA-TTT-CTC-TTG-TTT-GAG-<T>	ویژه تیلریا اوریتتالیس

۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت
 ۶۰ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به
 قسمت مکمل در رشته الگو
 ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولیل شدن پرایمرها یا
 زمان ساخت
 سی و چهار سری:
 ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت
 ۴۵ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به
 قسمت مکمل در رشته الگو
 ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولیل شدن پرایمرها یا
 زمان ساخت
 مرحله ۳: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس: زمان ساخت
 تکمیلی
 بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی
 ژل آگارز: اندازه محصول PCR در این مرحله ۶۳۹
 جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011).

تشخیص تک یاخته در خون با استفاده از روش PCR:
 به علت تنوع خاص گونه‌ای موجود در ژن حفاظتی
 (18SrRNA) از آن به‌عنوان یک شاخص در تشخیص
 دقیق گونه انگل‌ها، طبقه‌بندی تاکسونومیک و تحقیقات
 فیلوژنیک بهره‌برداری می‌شود (Salim *et al.*, 2010).
 مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو، ۲- Master mix
 محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای
 Tbs-S (20μM)، Tbs-A (20μM) (CinnaGen, Tehran; Iran)،
 ۴- آب دو بار تقطیر شده استریل.
 اندازه محصول PCR نمونه‌های خونی با استفاده از
 پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4)
 منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA آزموده شده و در

ارزیابی DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده
 از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):
 مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو Master mix، ۲-
 محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای
 Bba-S (P1)(20μM)، Bba-A (P2) (20μM) (CinnaGen, Tehran; Iran)،
 ۴- آب دو بار تقطیر شده
 استریل.
 روش آزمایش: بر روی کیسه یخ، در داخل هر
 میکروتیوب میزان ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix و ۰/۵
 میکرولیتر از هر پرایمر Bba-S(P1)(20μM) و Bba-A
 (P2)(20μM) و آب به اندازه نه میکرولیتر و ۲/۵
 میکرولیتر DNA الگو ریخته شد تا حجم نهایی محتوای
 میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر باشد و بلافاصله در دستگاه
 ترموسایکلر (Termal Cycler, Bio Rad; USA) با
 برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام می‌گرفت. نکته مهم
 این است که در قسمت اتصال پرایمرها به قسمت
 مکمل در رشته الگو یا (annealing) در هر مرحله از
 طول کار، می‌توان درجه حرارت را ۲-۳ درجه سانتی
 گراد بیشتر تنظیم کرد تا محصول نهایی دستگاه کیفیت
 بالاتری داشته باشد (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011).
 برنامه دستگاه ترموسایکلر:
 مرحله ۱: به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس:
 واسرشت (denaturation)
 مرحله ۲: دو سری:
 ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس: واسرشت
 ۹۰ ثانیه در ۶۵ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به
 قسمت مکمل در رشته الگو (annealing)
 ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس: طولیل شدن پرایمرها یا
 زمان ساخت (extention)
 دو سری:

بررسی حضور تیلریا آنولاتا با استفاده از روش مولکولی:
مواد مورد نیاز:

- (۱) فقط آن محصول PCR که مثبت شده
 - (۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran;) (Iran
 - (۳) پرایمرهای (P5)(20μM) Ta-S و Tbs-A (P4)(20μM) (CinnaGen, Tehran; Iran)
 - (۴) آب دو بار تقطیر شده استریل
- روش آزمایش: بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (P3) Tbs-S و (P4) Tbs-A منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی (P5) Ta-S و (P4) Tbs-A منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند.
- اندازه محصول در این مرحله برای تیلریا آنولاتا ۱۹۳ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

بررسی حضور تیلریا اوریتالیس با استفاده از روش مولکولی:

- مواد مورد نیاز:
- (۱) فقط آن محصول PCR که در دو مرحله قبل مثبت شده است.
 - (۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran;) (Iran
 - (۳) پرایمرهای (P6)(20μM) To-S و Tbs-A (P4)(20μM) (CinnaGen, Tehran; Iran)
 - (۴) آب دو بار تقطیر شده استریل

خانواده بابزی ایده بین ۴۰۰-۳۹۰ جفت باز می باشد، در صورتی که در خانواده تیلری ایده ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز است (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

Nested-PCR: حساسیت این روش بسیار بالاتر از روش PCR معمولی است.

ویژگی آن بالاتر از روش PCR معمولی می باشد (به علت وجود پرایمرهای داخلی).

چون در این روش، محصول به دست آمده از واکنش اول، به لوله جدیدی انتقال می یابد در صورت وجود موانعی برای PCR، غلظت آن نمونه‌ها کاهش می یابد (Shah Hoseini and Seyed Reza Tehrani, 2001).

انجام Semi-nested PCR: این روش کاملاً مشابه Nested-PCR می باشد ولی در آن فقط یکی از پرایمرها داخلی است و پرایمر دیگر، همان پرایمر اولیه می باشد. در مطالعه‌ای معلوم گردید که می توان از گسترش‌های خونی رنگ آمیزی شده نیز DNA را استخراج و بررسی کرد. یعنی با استفاده از روش مولکولی به طور همزمان گونه‌های تک یاخته را تفکیک کرد (Shayan and Rahbari, 2005).

موارد مثبت محصول PCR مرحله قبل، با پرایمرهای (P5) Ta-S و (P4) Tbs-A در این آزمایش مورد بررسی قرار می گیرند. نتایج این مرحله با الکتروفورز بر روی ژل آگارز نشان خواهد داد که چه تعداد از موارد مثبت مرحله قبل، منحصراً آلوده به تیلریا آنولاتا می باشند.

اگر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این گونه، چیزی تکثیر نگردد، باید متوجه بود که احتمال حضور گونه ای دیگر در نمونه وجود خواهد داشت (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

روش مولکولی و روش میکروسکوپی در این بررسی، «ضریب توافق کاپا» محاسبه شد.

یافته‌ها

- مطالعه میکروسکوپی: آشکال پیروپلاسمی تیلریا در نمونه‌های ۴ رأس دام بالغ از ۲۹۱ رأس گاومیش (۱/۳۷ درصد)، ۲ رأس دام نر (۱ درصد) و ۲ رأس دام ماده (۲ درصد) مشاهده شد.

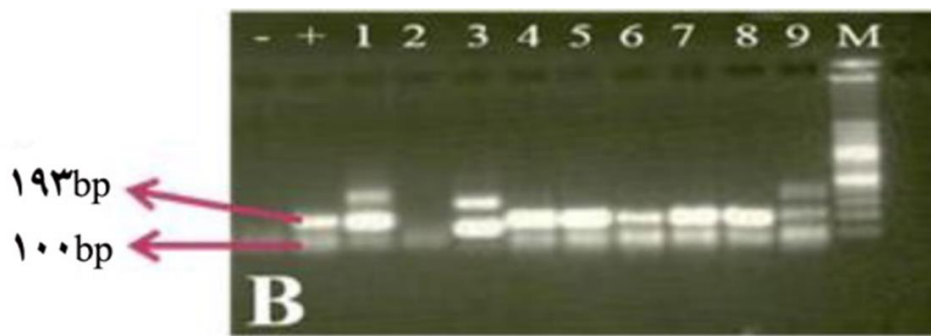
- مطالعه مولکولی: با استفاده از هشت پرایمری که در جدول ۲ مشخص شده، مطالعه مولکولی نشان داد که از کل نمونه‌ها، چهار رأس گاومیش بالغ شامل دو رأس نر (یک درصد) و دو رأس ماده (دو درصد) از ۲۹۱ رأس (۱/۳۷ درصد) به تیلریا آنولاتا آلوده بودند (شکل‌های ۲ و ۳).

روش آزمایش: بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی To-S (P6) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند. اندازه محصول در این مرحله برای تیلریا اوریتتالیس ۲۳۵ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad et al., 2011).

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار (SPSS Inc.'Chicago'IL'USA) نسخه ۲۲ به‌طور توصیفی و تحلیلی مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تحلیل داده‌ها از آزمون «مربع کای» (Chi square test) استفاده گردید. $p=0/05$ مبنای قضاوت آماری در نظر گرفته شد. جهت تعیین درجه همبستگی بین دو



شکل ۲- نتایج تکثیر DNAهای استخراج‌شده با پرایمرها



شکل ۳- نتایج تفکیک DNA تیلریا آنولاتا با پرایمرهای مربوطه

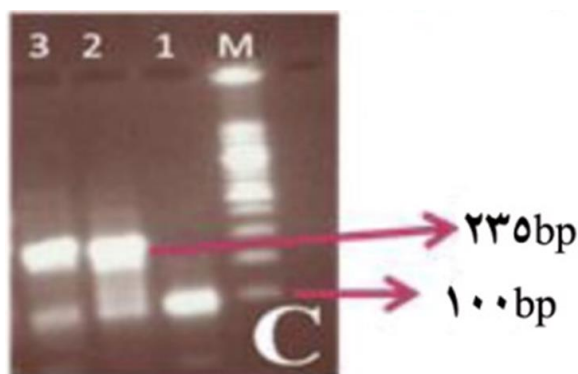
جدول ۳- مقایسه دو روش تشخیص تیلریا آنولاتا در گاومیش استان

آلودگی در روش میکروسکوپی				
جمع	منفی	مثبت		
۴	۰	۴	مثبت	
۲۸۷	۲۸۷	۰	منفی	آلودگی در روش مولکولی
۲۹۱	۲۸۷	۴	جمع	

نشان‌دهنده وجود همبستگی ۱۰۰ درصد بین این دو روش در تشخیص آلودگی گاومیش به تیلریا آنولاتا می‌باشد.

همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس (۰/۶۸ درصد) گاومیش ماده بالغ (دو درصد) به طور هم زمان به تیلریا اوریتالیس نیز آلوده بوده‌اند (شکل ۴). آلودگی به گونه های تیلریا آنولاتا و تیلریا اوریتالیس برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲/۲-۲/۳ درصد) بود ($p < ۰/۰۵$).

حساسیت و ویژگی روش میکروسکوپی در مقایسه با روش مولکولی (جدول ۳) به ترتیب یک و یک بود و ارزش اخباری موارد مثبت و منفی روش میکروسکوپی به ترتیب یک و یک برآورد شد. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی به تیلریا آنولاتا در روش مولکولی به ترتیب ۱/۳۷ درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۳۷-۱/۳۷ درصد) و یک درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۰-۲/۳ درصد) بود. ضریب توافق کاپا بین دو روش مولکولی و روش میکروسکوپی معادل ۱۷/۰۵ به دست آمد که



شکل ۴- نتایج تفکیک DNA تیلریا اوریتتالیس با پرایمرهای مربوطه

ارومیه ۲/۲ درصد بود. در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای ارتباط معنی داری را بین آلودگی این دو منطقه به انگل نشان نداد. ارتباط معنی داری بین موقعیت جغرافیایی و آلودگی مشاهده نگردید (جدول ۴).

از لحاظ حضور انگل به تفکیک شهرها، آلودگی به تیلریا اوریتتالیس در گاو میش های ارومیه اثبات گردید ولی این تک یاخته در نمونه های شهرهای سلماس و مهاباد و نقده مشاهده نشد. شیوع مولکولی تیلریا آنولاتا در شهرهای ارومیه و سلماس به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود. شیوع مولکولی تیلریا اوریتتالیس نیز در شهر

جدول ۴- نتایج تعیین مولکولی تک یاخته به تفکیک اقلیم مناطق استان

درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	تعداد نمونه	نوع و محل منطقه
۱/۳	۲	۱۴۶	خشک: مهاباد، سلماس
۲/۷	۴	۱۴۵	مرطوب: ارومیه، نقده

آلودگی این دو منطقه به تیلریا آنولاتا نشان نمی دهد (جدول ۵).

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، ارتباط معنی داری را بین

جدول ۵- نتایج تعیین مولکولی تیلریا آنولاتا به تفکیک اقلیم مناطق استان

درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	تعداد نمونه	نوع و محل منطقه
۱/۳	۲	۱۴۶	خشک: مهاباد، سلماس
۱/۳	۲	۱۴۵	مرطوب: ارومیه، نقده

را بین آلودگی این دو منطقه به تیلریا اوریتتالیس نشان نداد (جدول ۶).

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، نیز ارتباط معنی داری

جدول ۶- نتایج تعیین مولکولی تیلریا اوریتتالیس به تفکیک اقلیم مناطق استان

نوع و محل منطقه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	درصد آلودگی
خشک: مهاباد، سلماس	۱۴۶	۰	۰/۰۰۰
مرطوب: ارومیه، نقده	۱۴۵	۲	۱/۳

بحث و نتیجه‌گیری

این گزارش، نخستین گزارش آلودگی گاومیش به تیلریا اوریتتالیس توسط روش مولکولی در ایران است. همچنین نتایج آزمایش‌های مولکولی نشان داد که تیلریا آنولاتا شایع‌ترین گونه انگل در گاومیش‌های استان آذربایجان غربی می‌باشد. در این بررسی، برای اولین بار آلودگی هم‌زمان با گونه‌های تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا در گاومیش‌های منطقه شمال غربی ایران مشاهده شد. پیش از این، آلودگی هم‌زمان با گونه‌های تیلریا اوریتتالیس و تیلریا آنولاتا فقط در گاو با روش مولکولی در ایران گزارش شده بود (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011). تیلریا اوریتتالیس نخستین بار در گاو بومی ایران توسط روش سرمی تفکیک و گزارش شده بود (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984). یافته‌های ما در موافقت با نتایج پژوهش اویلنبرگ و هاشمی فشارکی است که انتقال تیلریا اوریتتالیس را در گاوهای شمال ایران، به وسیله کنه همافیزالیس پونکتاتا گزارش نموده بودند (Hashemi-Brown, 1990). علاوه بر این، حضور تیلریا اوریتتالیس در استان گلستان واقع در شمال ایران، می‌تواند فرضیه انتشار گسترده این تک یاخته را در بخش‌های شمالی کشور تقویت کند (Hoghooghi-Rad *et al.*, 2011). بالاترین میزان

آلودگی دام‌ها به تیلریا آنولاتا در ایران در استان خوزستان تا ۶۵/۸۳ درصد و در استان مجاور شرقی آن، کهگیلویه و بویر احمد تا ۵۷/۴۴ درصد در سال ۱۳۸۹ گزارش گردیده است که در این مورد، احتمال انتشار آلودگی انگلی در اثر حمل و نقل دام در همسایگی استان‌ها و در مسافت نزدیک، به ذهن خطور می‌کند (Safarpoor-Dehkordi *et al.*, 2012).

البته بر اساس بررسی‌ها، گونه تیلریا آنولاتا در گاوهای شرق ترکیه، در مجاورت شمال استان آذربایجان غربی با فراوانی ۴۵ درصد و گونه‌های گروه تیلریا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اوریتتالیس با فراوانی ۷ درصد وجود دارند (Aktas *et al.*, 2006).

همچنین در منطقه کردستان کشور عراق، واقع در مجاورت شهرهای جنوبی استان، میزان آلودگی گاوها به تیلریا آنولاتا با روش مولکولی ۶۸/۹ درصد گزارش شده است (Al-Saeed *et al.*, 2010). احتمال تأثیر حمل و نقل در مسافت نزدیک، بر انتشار این انگل از طریق کنه ناقل در بین دام‌های منطقه، بعید به نظر نمی‌رسد. وجود آلودگی در کشور ترکیه به تیلریا اوریتتالیس و مرز طولانی استان آذربایجان غربی با کشور ترکیه (۴۸۸ کیلومتر) و حمل و نقل تجاری در مسیری به کوتاهی فاصله ۵۵ کیلومتر در این ناحیه، شاید دلیل پراکندگی تیلریا اوریتتالیس در گاومیش‌های بومی شهر

ارومیه باشد. به عبارت دیگر احتمال می رود کنه های غیربومی آلوده، با خون خواری در گاو میش های بومی، تک یاخته ها را منتقل کرده باشند. البته این فرضیه برای اثبات، نیازمند رهیافت های مختلف تشخیصی در دام هایی است که عازم و راهی ایران می باشند.

فراوانی بیماری تیلریوز در میان دام ها به عواملی از قبیل رفتار زیرگونه های جغرافیایی انگل، نژاد دام، مبدأ انتقال دام، سن و وضعیت بدنی دام (بارداری، زایمان و غیره) و همچنین تغییرات ناگهانی محیط مربوط می شود. اضطراب زیاد و کاهش توان دستگاه ایمنی نیز می تواند باعث تبدیل آلودگی به بیماری بالینی گردد (Safarpour-Dehkordi *et al.*, 2012). کارشناسان تخمین می زنند که کنه ها در هر سال به میزان ده ها میلیارد دلار در دنیا خسارت ایجاد می کنند. در این میان، ابتلا به تیلریوز دهه هاست که باعث ضررهای زیادی در صنعت دامداری ایران می گردد (Hashemi-Fesharaki, 1988; Hashemi-Fesharaki *et al.*, 1998).

ناگفته نماند که زیان های اقتصادی ناشی از خانواده تیلریده، تاکنون در استان آذربایجان غربی تخمین زده نشده است. البته برخی کارشناسان حدس می زنند که در اغلب موارد در گاو میش بومی، این آلودگی انگلی به صورت تحت درمانگاهی بوده و یا حتی بدون نشانه بالینی می باشد. بدین ترتیب دام آلوده، تبدیل به «مخزن» انگل می شود که حتی در گسترش خونی آن، شکل پیروپلاسمی تک یاخته قابل مشاهده است. اهمیت دامی که به مخزن تک یاخته تبدیل می شود در آن است که کنه ناقل را آلوده کرده و سبب انتشار گسترده این انگل توسط آن کنه، به مدت چندین سال به دام های پاک می گردد (Ilhan *et al.*, 1998; Brown, 1990). آب و

هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری ایران، برای انتشار کنه های سخت جنس هیالوما به عنوان ناقل اصلی این انگل مناسب می باشد (Ranjbar-Bahadori *et al.*, 2006; Tavassoli, 2007). خاطر نشان می گردد که گروه تیلریا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اورینتالیس می توانند توسط کنه های هیالوما، همافیزالیس و حتی ریپی سفالوس نیز منتقل شوند (Savini *et al.*, 1998).

در بررسی حاضر، بین ابتلا به تک یاخته با وضعیت آب و هوای شهرهای استان ارتباط معنی داری مشاهده نگردید. بنابراین به نظر می رسد تأثیر اقلیم در بوم شناسی و فیزیولوژی کنه ها برای چهار شهر مورد مطالعه، کمابیش یکسان باشد و احتمالاً باید علل دیگری را در تفاوت میزان آلودگی در آنها مؤثر دانست. لازم به ذکر است که معمولاً در پاتوژنز بیماری تیلریوز، ۱۳-۱۱ روز بعد از گزش، فرم پیروپلاسمی در گسترش خون دام دیده می شود و در این فاصله اگر از دام مذکور، نمونه خونی جهت بررسی فرم مذکور اخذ شود، نتیجه منفی خواهد بود. در صورتی که با مطالعه لئوسیت های داخل گردش خون در این بازه زمانی، می توان فرم شیزونتی را مشاهده نمود. لذا عدم مطالعه لئوسیت های جریان می تواند نتایج منفی کاذب را به دنبال داشته باشد (Ahmad and Melhorn, 1999).

انگل های گروه تیلریتا سرجنتی، تیلریا بافلی و تیلریا اورینتالیس در سراسر دنیا پراکنده هستند. خود تیلریا اورینتالیس در چهار ژنوتیپ دسته بندی شده است: ایکدا (ikedda)، چیتوز (chitose)، بافلی (buffeli) و تیپ ۴ (type 4).

تیپ ایکدا، محدود به آسیای شرقی شامل کشورهای ژاپن، کره جنوبی، بخش شمال شرقی چین و

البته گونه بسیار بیماری‌زای *تیلیریا آنولاتا* به‌خاطر فعالیت دائمی کنه‌های جنس هیالوما معمولاً حضور بومی دارد که این کنه‌ها، گروه *تیلیریا سرجنتی/بافلی/اوریتالیس* را هم منتقل می‌کنند (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984).

دامداران عادت دارند در فصل تابستان، توجه بیشتری به کنترل کنه‌ها داشته باشند و از دام‌های خود در فصل پاییز که مقارن با هجوم پاییزی کنه‌ها می‌باشد، غفلت می‌نمایند. ظاهراً اعتقاد دامپروران بر این است که دام‌های آنها فقط در مراتع تابستانی مورد خونخواری کنه‌های آلوده دشت‌ها قرار می‌گیرند. ولی ممکن است در اصطبل‌های پاییزی که دام‌های زیادی در مجاورت یکدیگر نگاه‌داری می‌شوند، تعدادی نیز مورد خونخواری کنه‌های آلوده قرار گیرند. البته از آنجا که گاوها و گاو میش‌های مذکور، علایم درمانگاهی بیماری را ندارند، شاید به مخزنی برای آلودگی سایر دام‌ها تبدیل شوند.

این نکته ایجاب می‌کند که برای پیشگیری از انتقال آلودگی‌ها و حفظ بهره‌وری سرمایه‌های دامی کشورهای ایران، ترکیه و عراق برای نسل‌های آینده، بخش قرنطینه دامپزشکی بیش از پیش مورد توجه سازمان‌های دولتی طرفین مرزها قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از شرکت MBST به‌خاطر تهیه کیت‌های آزمایشگاهی و کمک‌های فنی سپاسگزاری می‌شود.

نیز استرالیا است. البته محققان دیگری، وجود پنج تیپ از این گونه تک‌یاخته را بر اساس طبقه‌بندی پروتئین سطحی عمده فرم پیروپلاسمی آنها گزارش نموده‌اند (Yokoyama et al., 2011; Ota et al., 2009). ترکیب نوکلوتیدهای (G+C) در ژنوم *تیلیریا اوریتالیس* بیشتر از ترکیب آن در گونه‌های *تیلیریا پاروا* و *تیلیریا آنولاتا* بوده است ولی از طرف دیگر مشابه جنس *بابزیا بویس* می‌باشد. تحلیل شجره‌نامه در مورد این تک‌یاخته نشان داده است که بعد از انشعاب خانواده *تیلیریده* از خانواده *بابزیده*، دو گونه بسیار بیماری‌زا از *تیلیریا اوریتالیس* مشتق شده‌اند (Hayashida et al., 2012).

در ایران، تاکنون هیچ گزارشی از تفکیک تیپ‌های *تیلیریا اوریتالیس* ارائه نشده است. البته این مطلب به مطالعات بیشتر و وسیع‌تری نیاز دارد.

از آنجا که عامل استرس گرمایی تضعیف‌کننده دستگاه ایمنی است، بنابراین می‌تواند شدت و دوره بیماری را در مناطق گرمسیری افزایش دهد. در هر استانی از کشور که دارای اقلیم خشک و نسبتاً گرمی است، کنه‌های سخت به وفور یافته می‌شوند و این نکته، شاید الگوی انتشار *تیلیریا آنولاتا* را بتواند توجیه کند.

در این استان، اغلب دام‌های مبتلا به نوع مزمن بیماری، احتمالاً در آغاز فصل زمستان آلوده شده‌اند و در ابتدای فصل تابستان به ندرت ابتلای مزمن داشته‌اند. به نظر می‌رسد که در طول فصل پاییز، مرحله کوتاه ابتدایی آلودگی لنگاوای وقوع یافته و سپس در زمستان به مرحله مزمن خونی رسیده است.

تیلیریا اوریتالیس در هنگام نمونه‌برداری زمستانی (متعاقب اوج فعالیت پاییزی کنه‌های جنس همافیزالیس در منطقه) در شکل آلودگی مزمن وجود داشته است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Ahmad, J.S. and Melhorn, H. (1999). Review: The cellular basis of the immunity and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitological Research*, 85(7): 539-549.
- Aktas, M., Altay, K. and Dumanli, N. (2006). A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology*, 138(3-4): 179-185.
- Al-Saeed, A., Lokman, O., Mohammed, J. and Ahmed, J. (2010). Epidemiological studies on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Kurdistan region, Iraq. *Parasitology Research*, 106(2): 403-407.
- Arjmand-Yamchi, J. and Tavassoli, M. (2016). Survey on infection rate, vector and identification of *Theileria annulata* in cattle from Northwest, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3): 1071-1076.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S. and Gardner, M. (2004). *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by Ixodid ticks. *Parasitology*, 129 Suppl: 271-283.
- Brown, C.G.D. (1990). Control of tropical theileriosis (*T. annulata* infection) of cattle. *Parasitologia*, 32(1): 23-31.
- Hashemi-Fesharaki, R. (1988). Control of *T. annulata* in Iran. *Parasitology Today*, 4(2): 36-40.
- Hashemi-Fesharaki, R., Habibi, G.R. and Hourai, P. (1998). Delayed type hypersensitivity theilerian test in cattle vaccinated against *T. annulata* infection. *Veterinary Parasitology*, 75(2-3): 261-267.
- Hayashida, K., Hara, Y., Abe, T., Yamasaki, C., Toyoda, A., Kosuge, T., *et al.* (2012). Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation. *MBio American Society of Microbiology*, 10(1128)/mBio: 00204-00212.
- Hoghooghi-Rad, N., Ghaemi, P., Shayan, P., Eckert, B. and Sadr-Shirazi, N. (2011). Detection of native carrier cattle infected with *Theileria annulata* by Semi-nested PCR and smear method in Golestan province of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 12(3): 317-323.
- Hoseini, S.H., Haddadzadeh, H., Meshgi, B., Nabian, S. and Razavi, M. (2003). Domestic animals parasitic infections. Iran: Tehran, Tehran University Press, pp: 41-57. [In Persian]
- Ilhan, T., Williamson, S., Kirvar, E., Shields, B. and Brown, C.G. (1998). *T. annulata*: Carrier state and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 29(849): 109-125.
- Ota, N., Mizuno, D., Kuboki, N., Igarashi, I., Nakamura, Y., Yamashina, H., *et al.* (2009). Epidemiological survey of *T. orientalis* in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7): 937-944.
- Ranjbar-Bahadori, Sh., Eslami, A. and Aghaebrahimi-Samani, R. (2007). A survey on parasitic Infestation of native ruminants of Golestan Province. *Journal of Veterinary Research*, 62(5): 303-305.
- Safarpour-Dehkordi, F., Parsaei, P., Saberian, S., Moshkelani, S., Hajshafiei, P., Hoseini, S.R., *et al.* (2012). Prevalence study of *T. annulata* by comparison of four diagnostic techniques in Southwest Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 15(2): 123-130.
- Salim, B., Bakheit, M.A., Kamau, J., Nakamura, I. and Sugimoto, C. (2010). Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *T. equi* from horses in Sudan. *Parasitology Research*, 106(2): 493-498.

- Savini, G., Onuma, M., Scaramozzino, P., Kakuda, T., Semproni, G. and Langella, V. (1998). First report of *T. sergenti* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in Italy. Annual New York Academy Science, 849: 404-407.
- Shah Hoseini, M.H. and Seyed Reza Tehrani, S.M. (2001). Polymerase chain reaction. Iran: Tehran, Parsian Press, pp: 127-159. [In Persian]
- Shayan, P. and Rahbari, S. (2005). Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. Parasitology Research, 62(2): 15-20.
- Shaw, M.K. (2002). *Theileria* development and host cell invasion. In: World Class Parasites, 3, *Theileria*. Dobbelaere, D.A.E. and Mc Keever, D.J. editors. UK: London, Kluwer, Boston, pp: 1-22.
- Striepen, B., Jordan, C.N., Reiff, S. and van Dooren, G.G. (2007). Building the perfect parasite: Cell division in Apicomplexa. PLOS Pathogens, 3: 691-698.
- Tavassoli, M. (2006). Veterinary Protozoology. 1st ed., Iran: Urmia, Jahad Daneshgahi Press, pp: 186-200. [In Persian]
- Thrusfield, M. (2005). Veterinary Epidemiology. 3rd ed., UK: Oxford, Blackwell Publishing, pp: 232-234.
- Uilenberg, G. and Hashemi-Fesharaki, R. (1984). *T. orientalis* in Iran. Veterinary Quarterly, 6(1): 1-4.
- Yokoyama, N., Ueno, A., Mizuno, D., Kuboki, N., Khukhuu, A., Igarashi, I., *et al.* (2011). Genotypic diversity of *Theileria orientalis* detected from cattle grazing in Kumamoto and Okinawa prefectures of Japan. Journal of Veterinary Medical Sciences, 73(3): 305-312.