تشخیص ملکولی تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس در گاوهای شهرستان شهرضا، جنوب استان اصفهان

محمودرضا سلطانی[۱]، وحید نعمان[۲*]، یاسر پیرعلی[۳]، حمیدرضاعزیزی[٤]

چکیده

تیلریا ها از انگل‌های خونی مهم گاو می‌باشند که توسط کنه‌های ایکسودیده منتقل‌شده 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. درمجموع 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 ٤۰۰ جفت بازی از ژن S rRNA۱۸ جنس تیلریا را تکثیر می‌کرد، تکثیر شد. تمامی نمونه‌های مثبت با semi-nested PCR اختصاصی ازنظر وجود تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس بررسی شدند و آلودگی نمونه‌ها ازنظر تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس به ترتیب ۹٪/۵٤ و ٤۷٪ تشخیص داده شد. آزمون مربع کای جهت مقایسه میزان شیوع نسبت به فصل سال، نوع دامداری، بهداشت دامداری، ناقلین بندپا، سن دام و تولید شیر انجام شد. در مقایسه فراوانی گونه تیلریا اورینتالیس در گاو بین فصول مختلف نمونه‌گیری، حضور ناقلین و سطح بهداشتی دامداری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<0.05$). بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به فصل بهار، حضور کنه و سطح بهداشتی معمولی دامداری بود. در مقایسه آزمون میکروسکوپی با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱٤/۳۹ 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

تیلریا ها در شاخه اپی کمپلکسا (Apicomplexa)، رده اسپوروزوآ (Sporozoea)، راسته پیروپلاسمیدا (Piroplasmida) و خانواده تیلریده قرار می‌گیرند و از مهم‌ترین تک‌یاخته خونی می‌باشند که توسط کنه‌های سخت منتقل‌شده و بیماری ملایم تا کشنده در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی ایجاد می‌کنند (۱). تیلریا آنولاتا عامل اصلی بیماری تیلریوزیس گاوی در ایران است که توسط کنه 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 اورینتالیس یکی از گونه‌های خوش‌خیم تیلریا در ایران و جهان است که اورینتال تیلریوزیس را در گاو ایجاد می‌کند(۲). علائم بالینی ناشی از تیلریا اورینتالیس 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 ازلحاظ مورفولوژی شبیه بوده و تشخیص پیروپلاسم ها 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، عدم‌تشخیص 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 گاوی 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 واکسن 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

٤-دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد ، ایران

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(٤).

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 انجام‌شده است(۵). در خصوص شناسایی تیلریا اورینتالیس تحقیقات اندکی در ایران انجام‌شده است و این انگل تنها در استان‌های شمالی ایران مانند مازندران و گلستان مورد شناسایی قرارگرفته است(۲).

ازآنجاکه 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 گزارش‌شده 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 روش‌کار

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 (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 ازنظر 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 بارنگ 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 ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت، علاوه بر این

DNA استخراجی بر روی ژل آگارز مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

واکنش PCR و Semi-nested PCR

در این تحقیق برای شناسایی جنس تیلریا از دو آغازگر روبه‌جلو ThBab1 (5' CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3') و معکوس ThBab2 (5' CTAAGAATTTCACCTCTGACAG 3') از ژن ۱۸S rRNA که قطعه‌ای در حدود ٤٣٠-٤٠٠ جفت باز را تکثیر می‌کردند استفاده شد(٦). ژن ۱۸S rRNA 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 محصول واکنش PCR استفاده شد. در این واکنش برای تکثیر اختصاصی تیلریا آنولاتا و تیلریا اورینتالیس به ترتیب از دو آغازگر روبه‌جلو T. annulata(F) (5` CCTCTGGGGTCTGTGCA 3`) و T. orientalis (F) (5` GGCTTATTTCGGTTTGATTTT 3`) استفاده شد که محصول هر یک از این آغازگرهای اختصاصی با آغازگر معکوس ThBab2 برای تیلریا آنولاتا ۲۲۵ جفت باز و برای تیلریا اورینتالیس 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 PCR (X10)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ mMبا غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (10mM) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر روبه‌جلو ۲۰ µMبا غلظت نهایی ۰/٤ میکرو مولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس۲۰ µMبا غلظت نهایی ۰/٤ میکرو مولار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (5U/ µL)با غلظت نهایی ۰/٦۲۵ 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 DNA الگو به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر از واکنش PCR اولیه در حجم ۲۵ میکرولیتر بود. پس از ترکیب مواد موردنیاز 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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، مرحله اتصال DNA در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی تیلریا آنولاتا ۵۷ و تیلریا اورینتالیس ۵۳ درجه سانتی‌گراد بود) به مدت ٤۵ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ 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 ٦۰ 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 پروتوکل های ایمنی) و پس از شست و شوی با آب مقطر برای نمایان شدن باندها و عکس‌برداری در دستگاه تابنده اشعه فرابنفش (ژل داک) قرار گرفت.

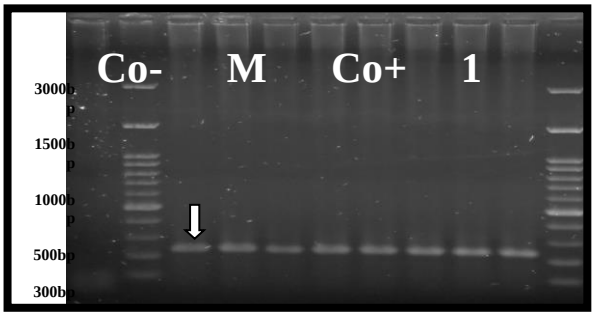
-محاسبات آماری

نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه‌وتحلیل آماری شدند. برای محاسبه فراوانی داده‌ها و برای پی بردن به اینکه کدام‌یک از فراوانی‌ها با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری دارند، از آزمون مربع کای (۲ (χاستفاده شد. همچنین جدول توزیع شیوع ملکولی تیلریا در گاو بر اساس فصل، نوع دامداری ازنظر مدیریت، سطح بهداشتی دامداری، ناقلین بندپا در دامداری، سن دام و وضعیت تولید شیر رسم شد. سطح معنی‌داری P-value≤ 0.05 در نظر گرفته شد. علاوه بر این حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی

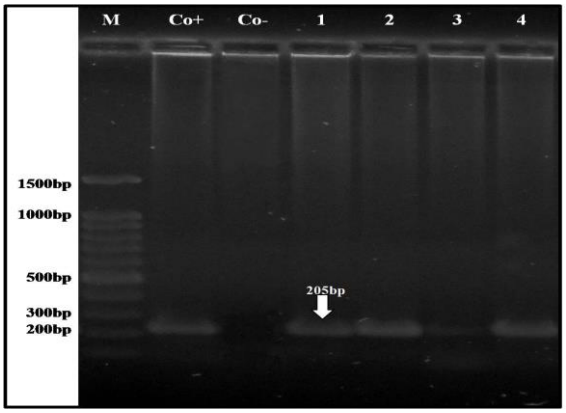
نسبت به آزمون ملکولی محاسبه شد. علاوه بر این ضریب کاپا در خصوص تطابق دو آزمون محاسبه گردید.

نتایج

درمجموع از ۲۵۳ گسترش خونی بررسی‌شده با میکروسکوپ نوری ۲۱ (۸/۳٪) نمونه ازنظر حضور *تیلریا آنولاتا* شکل مثبت تشخیص داده شدند و در هیچ‌یک از نمونه‌ها *تیلریا اورینتالیس* تشخیص داده نشد. در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی *تیلریا آنولاتا* ۱۳۹ نمونه (۵٤/۹٪) از ۲۵۳ نمونه مورد آزمایش باند موردنظر را تشکیل دادند (نگاره ۱). در واکنش Semi-nested PCR اختصاصی *تیلریا اورینتالیس* ۱۱۹ نمونه (٤۷٪) از ۲۵۳ نمونه مورد آزمایش باند موردنظر را تشکیل دادند (نگاره ۲). در مقایسه فراوانی گونه *تیلریا آنولاتا* در گاو ازنظر 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 اورینتالیس* در گاو بین فصول مختلف نمونه‌گیری شده اخلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به فصل بهار، تابستان و پاییز بود ($p<0.0001$). در مقایسه فراوانی گونه *تیلریا اورینتالیس* در گاو بین سطوح بهداشتی دامداری‌ها اخلاف معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین فراوانی مربوط به دامداری‌هایی بود که سطح بهداشتی معمولی داشتند ($p<0.05$). در مقایسه فراوانی گونه *تیلریا اورینتالیس* در گاو بین حضور ناقلین (کنه، مگس گزنده) اخلاف 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 اورینتالیس* در گاو ازنظر نوع مدیریت دامداری، سن دام و وضعیت تولید شیر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در مقایسه آزمون میکروسکوپی با آزمون ملکولی، حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱٤/۳۹ و ۹۹/۱۲ درصد تعیین گردید (جدول ۲). محاسبه ضریب کاپا بین آزمون ملکولی و میکروسکوپی تیلریا (۵۰ فیلد) 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 ۲۲۵bp، Co- کنترل منفی، Co+ - کنترل مثبت، M: مارکر ۱۰۰bp



نگاره ۲- تشخیص *تیلریا اورینتالیس* در شهرستان شهرضا به روش Semi-nested PCR. ۱ تا ٤ نمونه‌های Semi-nested PCR و تکثیرشده با جفت آغازگر *T. orientalis* (F) و ThBab2(R)، محصول ۲۰۵bp، Co- کنترل منفی، Co+ - کنترل مثبت، M: مارکر ۱۰۰bp

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

طبقه	سطح	تعداد دام	*تیلریا آنولاتا*			*تیلریا اورینتالیس*		
			مثبت		P value	مثبت		P value
			تعداد	درصد		تعداد	درصد	
کل	-	۲۵۳	۱۳۹	۵٤/۹		۱۱۹	٤۷	
فصل	پاییز	۱۲۰	٦۲	۷/۵۱	۵۱۲/۰	۳۳	۵/۲۷	۰۰۰۱/۰*
	بهار	۲۲	۱٤	٦/٦۳		۱۵	۲/٦۸	
	تابستان	۱۱۱	٦۳	۸/۵٦		۷۱	٦٤	
نوع دامداری	نیمه‌صنعتی	۹۷	۵۰	۵/۵۱	۳۹۲/۰	٤۰	۲/٤۱	۱٤۵/۰
	سنتی	۱۵٦	۸۹	۱/۵۷		۷۹	٦/۵۰	
سطح بهداشتی دامداری	خوب	۷۷	۳۹	٦/۵۰	۱۵۱/۰	۲۷	۱/۳۵	۰۱۵/۰*
	پایین	۱۱۰	۵۷	۸/۵۱		۵۳	۲/٤۸	
	معمولی	٦٦	٤۳	۲/٦۵		۳۹	۱/۵۹	
ناقلین بندپا در دامداری	مگس گزنده	۲۲۰	۱۱۹	۱/۵٤	٤۸۳/۰	۹۵	۲/٤۳	۰۰۲/۰*
	کنه	۳۳	۲۰	٦/٦۰		۲٤	۷/۷۲	
سن دام	۱ تا ۳ سال	٤	٤	۱۰۰	۱۵۱/۰	۱	۲۵	۱۰۳/۰
	۳ تا ۵ سال	۱۸۵	۹۸	۵۳		۸۱	۸/٤۳	
	بالای ۵ سال	٦٤	۳۷	۸/۵۷		۳۷	۸/۵۷	
وضعیت تولید شیر	بالا	۸۳	٤۳	۸/۵۱	۵۰۲/۰	۳۳	۸/۳۹	۱۰۰/۰
	پایین	۵۱	۲٦	۵۱		۳۰	۸/۵۸	
	معمولی	۱۱۹	۷۰	۸/۵۸		۵٦	۱/٤۷	

* $p<0.05$

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	۱٤/۳۹[۱]	۹۹/۱۲[۲]

[۱] حساسیت آزمون میکروسکوپی در تشخیص تیلریا= مثبت واقعی/(مثبت واقعی+منفی کاذب)*۱۰۰ [۲] ویژگی آزمون میکروسکوپی در تشخیص تیلریا = منفی واقعی/(منفی واقعی+ مثبت کاذب)*۱۰۰

بحث

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 سنتی 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 به‌حساب 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 میکروسکوپی ۸/۳٪ از نمونه‌ها و در آزمون ملکولی ۵٤/۹٪ از نمونه‌ها ازنظر *تیلریا آنولاتا*، مثبت تشخیص داده شدند. در مطالعات انجام‌شده در خصوص بررسی شیوع *تیلریا آنولاتا* در گاو با استفاده از روش میکروسکوپی و ملکولی در مناطق مختلف ایران و دنیا نیز نتایج مشابهی ثبت‌شده است که نشان‌دهنده حساسیت بالاتر آزمون‌های ملکولی نسبت به آزمون میکروسکوپی است: در جنوب شرقی ایران ۱۰/٦٦٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ٤٥/۳۳٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزوآیت ازنظر *تیلریا آنولاتا* مثبت بودند(۱۰)، در منطقه سیستان ٦/۲۵٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ٤۷/۵٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزوآیت ازنظر *تیلریا آنولاتا* مثبت بودند(۱۱)، در هند ۲۳/۸٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۹۰/٤۷٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن آنتی‌ژن سطحی مروزوآیت ازنظر *تیلریا آنولاتا* مثبت بودند(۱۲) و در پاکستان ۱/۹٪ نمونه‌ها با آزمون میکروسکوپی و ۱۹/۳٪ با آزمون ملکولی با استفاده از ژن 18S rRNA ازنظر *تیلریا آنولاتا* مثبت بودند(۱۳). تفاوت مشخص در شیوع *تیلریا آنولاتا* در مناطق یک کشور و کشورهای مختلف

ناشی از تنوع گسترش گونه‌های ناقل تیلریا، تفاوت اکولوژیکی، نوع آب‌وهوا، مدیریت گاوداری، مقاومت کنه‌ها به سموم، زمان نمونه‌گیری، سن، جنس و نژاد جمعیت تحت مطالعه و حساسیت و ویژگی آزمون‌های 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 انجام‌شده در منطقه سیستان مطابقت داشت(۱۱).

حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی به ترتیب ۱٤/۳۹ و ۹۹/۱۲ درصد نسبت به آزمون ملکولی، تعیین شد و ضریب کاپا نشان‌دهنده سطح ضعیف توافق دو آزمون بود. آزمون‌های ملکولی می‌توانند یک گلبول آلوده به انگل را در ۱۰۰۰۰۰ گلبول سالم شناسایی کنند(۹) ولی بررسی میکروسکوپی شناسایی گونه‌های *تیلریا* بر اساس مشخصات مورفولوژیکی دارای حساسیت و ویژگی پایینی است زیرا تشخیص و تفریق فرم پیروپلاسمی در گلبول‌های قرمز گاوهای حامل جهت تشخیص گونه بسیار دشوار و وقت‌گیر است(۱). در مطالعات دیگر انجام‌شده حساسیت و ویژگی آزمون میکروسکوپی نسبت به آزمون ملکولی به ترتیب بین ۱۳–۵۷ درصد و ۹۹–۹۰/٤۷ درصد تعیین‌شده که نشان‌دهنده سطح ضعیف توافق یا عدم توافق دو آزمون بود و با نتایج این تحقیق همخوانی دارد(۱۱, ۱۲, ۱٤).

در این مطالعه ٤۷٪ از نمونه‌ها با آزمون Semi-nested PCR *ازنظر تیلریا اورینتالیس* مثبت تشخیص داده شدند. در مطالعات دیگر انجام‌شده در استان‌های گلستان و آذربایجان غربی به ترتیب ۵/٦۲٪ و ۷/۸٪ از گاوها با آزمون ملکولی با استفاده از ژن 18S rRNA به *تیلریا اورینتالیس* آلوده بودند که در مقایسه با این مطالعه آلودگی کمتری را داشتند(۲, ۱۵). در مطالعات ملکولی انجام‌شده با استفاده از ژن‌های18S rRNA و MPSP در هند، تایلند، چین و مصر شیوع این انگل به ترتیب ۷۸٪، ۳۰٪، ۲/٦٪ و ۰/٤۵٪ گزارش‌شده است(۱٦–۱۹).

در این مطالعه نیز مانند دیگر مطالعات انجام‌شده آلودگی توأم *تیلریا اورینتالیس* و *تیلریا آنولاتا* در ۸۰ نمونه از ۲۵۳ نمونه (۳۱/٦٪) مشاهده شد(۲, ۱۵, ۱۹). فصل، سطوح بهداشتی دامداری و حضور ناقلین (کنه) از عوامل مؤثر در شیوع *تیلریا اورینتالیس* در این تحقیق بودند. در مطالعه انجام‌شده در اصفهان نشان داده‌شده است که در اواسط بهار حضور کنه بر روی بدن گاوها افزایش می‌یابد و در تابستان به اوج خود می‌رسد و در پاییز از تراکم حضور کنه بر روی بدن دام کاسته می‌شود؛ بنابراین ارتباط فراوانی عامل بیماری با فصل فعالیت کنه در استان دور از ذهن نیست(۲۰). در بررسی‌های انجام‌شده در مصر عوامل سن، نژاد، اکولوژی منطقه، اقدامات مدیریتی، کنترل انگل‌های خارجی، حضور گونه‌های دیگر دام در دامداری، موقعیت دامداری از عوامل خطر شیوع *تیلریا اورینتالیس* بودند(۱۹). درصورتی‌که 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 به‌عنوان عوامل خطر شیوع *تیلریا اورینتالیس* بودند(۱۷, ۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شیوع *تیلریا اورینتالیس* و *تیلریا آنولاتا* نسبت به یافته‌های 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 نه‌تنها قابلیت تفریق گونه‌های *تیلریا را*

دارد بلکه حساسیت آزمون ملکولی تقریباً هفت برابر آزمون میکروسکوپی می‌باشد.

تشکر و سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان که ما را در انجام این پایان‌نامه یاری نمودند تقدیر و تشکر انجام می‌شود.

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, Fakhar 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 BovineTheileria and Babesia Species by Reverse Line Blot Hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(6):1782-1789.
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.

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.