

مقایسه حضور تک یاخته‌های خونی در گاوهای به ظاهر سالم مناطق مختلف جغرافیایی کشور با استفاده از روش PCR

بهاره چشتی^۱، غلامرضا رزمی^{۲*}، ابوالقاسم نقیعی^۳

۱. کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. استاد بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. دانشیار بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱ مهر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۶ شهریور ۱۳۹۲

چکیده

بازیوز و تیلریوز از بیماری‌های مهم منتقله توسط کنه می‌باشند که به علت کم خونی، لاغری، مرگ و میر و کاهش فراورده‌های دامی سبب خسارت اقتصادی زیادی در صنعت دامپروری کشور می‌شود. در این مطالعه با هدف بررسی میکروسکوپی و ملکولی آلودگی به تیلریا و بازیوز در گاوهای سه منطقه آب و هوایی گرم و خشک، کوهستانی و خزری انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۲۷۰ نمونه خون حاوی ماده ضدانعقاد در فصول بهار و تابستان از گاوهای شهرستان یزد (منطقه کویری)، تربت جام (منطقه نیمه کوهستانی) و تنکابن و رامسر (منطقه خزری) جمع آوری گردید. نمونه‌های جمع آوری شده به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا از نمونه‌های خون گسترش تهیه و سپس با گیمسا رنگ آمیزی شدند. همچنین DNA خون، با استفاده از کیت تجاری استخراج و سپس آزمایش PCR طی دو مرحله جهت تشخیص آلودگی به تیلریا و بازیوز در گاوهای مورد بررسی انجام شد. در بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی آلودگی به گونه‌های تیلریا در ۴ نمونه خون از گاوهای شهرستان یزد مشاهده گردید. همچنین با استفاده از روش PCR آلودگی به تیلریا آنولاتا در ۱۲ نمونه خون از گاوهای شهرستان یزد، یک نمونه خون از گاوهای شهرستان تربت جام و ۳ نمونه خون از گاوهای شهرستان‌های رامسر و تنکابن آلودگی را تایید نمود. در این مطالعه هیچ گونه آلودگی به بازیوز مشاهده نگردید. نتایج حاصله مبین اهمیت بیشتر آلودگی به تیلریا آنولاتا در گاوهای مناطق مختلف ایران می‌باشد.

کلمات کلیدی: تیلریا، بازیوز، گاو، PCR

* نویسنده مسئول: غلامرضا رزمی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن:

پست الکترونیک: Razmi@um.ac.ir

مقدمه

تیلریوز و بابزیوز مهم‌ترین بیماری‌های منتقله توسط گاو می‌باشند که با علائمی شامل تب، زردی، لاغری و هموگلوبینوری بروز می‌نمایند (۱۵). تیلریا *انولاتا*، تیلریا پاروا، بابزیا بویس، بابزیا باجمینا از عوامل اصلی تیلریوز و بابزیوز در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری هستند (۱۸). تیلریا *انولاتا* گسترده‌گی جغرافیایی بالایی دارد و در اروپای جنوبی، ساحل مدیترانه، خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیا مشاهده می‌شود و تیلریا پاروا نیز در آفریقای شرقی و مرکزی پراکنده است (۱۵). طی مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده آلودگی گاوها به بابزیا باجمینا و بابزیا بویس از آسیا، آفریقا، اروپا، آمریکای جنوبی و شمالی گزارش شده است (۱۵). تیلریا *انولاتا* شیوع نسبتاً بالایی در گاوهای مناطق مختلف ایران دارد (۶). درباره شیوع آلودگی بابزیایی در گاوهای ایران اطلاعات کمی وجود دارد و آلودگی بابزیایی در گاوهای استان مازندران، گیلان و کردستان گزارش شده است (۱۹، ۱۱، ۵). با توجه به اهمیت بهداشتی تک یاخته‌های خونی در گاو و همچنین اطلاعات اندک درباره آلودگی بابزیایی در گاوهای مناطق مختلف ایران، در مطالعه حاضر سعی گردیده است میزان آلودگی به تیلریا و بابزیا در گاوهای به ظاهر سالم در سه منطقه آب و هوایی کویری (یزد)، کوهستانی (تربت جام) و خزری (تنکابن و رامسر) با روش مولکولی مورد مقایسه قرار گیرند.

مواد و روش کار

طی سال ۱۳۹۱ خونگیری از گاوهای سه شهرستان یزد، تربت جام و تنکابن با آب و هوای کویری، نیمه کوهستانی و خزری با هماهنگی اداره دامپزشکی شهرستان‌ها و کلینیک‌های دامپزشکی در فصول بهار و

تابستان انجام گرفت. از مجموع ۲۷۰ نمونه جمع‌آوری شده، تعداد ۱۰۰ نمونه متعلق به گاوهای شهرستان تربت جام، ۱۰۰ نمونه متعلق به گاوهای شهرستان یزد و ۷۰ نمونه متعلق به گاوهای شهرستان‌های تنکابن بودند. ابتدا مشخصات سن و جنس گاوهای نمونه برداری شده ثبت گردید و سپس با ضدعفونی کردن و رید و داج با پنبه آغشته به الکل، با سرنگ ۵ سی سی، ۳ میلی لیتر خون گرفته و به لوله ی و نوجکت حاوی ماده ضدانعقاد (EDTA) منتقل گردید. لوله ی حاوی خون در ظرف حاوی یخ قرار داده شد. همزمان توسط سروسوزن استریل ورید گوش سوراخ شد و یک قطره خون روی لام منتقل شد و سپس گسترش نازک تهیه و شماره زده شد. لوله‌های خون به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل گردید و تا هنگام استخراج DNA در فریزر منفی ۲۰ درجه ی سانتیگراد نگهداری شدند. در آزمایشگاه گسترش‌های خونی با متانول ثابت شد و با رنگ گیمسای ۵٪ به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. پس از شستن لام‌های رنگ شده بوسیله آب و خشک نمودن آنها، گسترش‌های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری به مدت ۵ دقیقه با عدسی روغنی مورد بررسی قرار گرفتند. DNA نمونه‌های خون EDTA با استفاده از کیت تجاری (شرکت سیناژن، تهران) مطابق دستور العمل کیت، مورد استخراج قرار گرفتند. برای تشخیص جنس تیلریا و بابزیا از روش PCR با استفاده از پرایمرهای P1 و P2 یونیورسال و بر اساس متد شایان و رهبری (۲۰۰۵) استفاده گردید (۱۷). محصول PCR مربوط به جنس بابزیا بر روی ژل آگاروز ۱٪ در صد، سایز باند ۴۰۲-۳۸۹ جفت باز و محصول PCR مربوط به تیلریا، سایز باند ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز را تشکیل می‌دهد. جهت تشخیص گونه‌های بابزیا و تیلریا، نمونه‌هایی که در مرحله اول PCR از نظر

تنها در ۴ گسترش خونی از گاوهای نواحی کویری (شهرستان یزد) آلودگی به تیلریا مشاهده شد. همچنین در مرحله اول PCR به ترتیب ۱۲ نمونه خون گاوهای شهرستان یزد، یک نمونه خون گاوهای شهرستان تربت جام و ۳ نمونه خون گاوهای شهرستان‌های رامسر و تنکابن فقط به تیلریا آلوده بودند (جدول ۱). در آزمایش PCR مرحله دوم نیز با پرایمرهای اختصاصی آلودگی تمام نمونه‌های مثبت در مرحله اول به تیلریا آنولاتا تایید شدند.

آلودگی تیلریا مثبت بودند، با پرایمرهای اختصاصی گونه تیلریا آنولاتا با روش اولیویرا و همکاران (۱۹۹۵) (۹) و نمونه‌های بانزیا مثبت نیز با پرایمرهای اختصاصی بانزیا بایجمینا و بانزیا بویس با روش فیگورا و همکاران (۱۹۹۶) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۲). در هر PCR حداقل یک نمونه واجد خون غیر آلوده بعنوان کنترل منفی و یک نمونه خون آلوده بعنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

نتایج

از مجموع ۲۷۰ گسترش خون تهیه شده از گاوهای نواحی کویری، نیمه کوهستانی و خزری،

جدول ۱- فراوانی آلودگی تیلریا آنولاتا در گاوهای به ظاهر سالم در مناطق مختلف جغرافیایی ایران

جمع	نتایج ملکولی		نتایج میکروسکوپی		روش آزمایش مناطق
	تعداد مثبت (%)	تعداد منفی	تعداد مثبت (%)	تعداد منفی	
۱۰۰	۱۱ (۱۱٪)	۸۹	۴ (۴٪)	۹۶	خشک (یزد)
۱۰۰	۱ (۱٪)	۹۹	۰	۱۰۰	نیمه کوهستانی (تربت جام)
۷۰	۳ (۴/۲۸٪)	۶۷	۰	۷۰	خزری (تنکابن)
۲۷۰	۱۵	۲۵۵	۴	۲۶۶	جمع

توسط مظفری و همکاران (۱۳۸۲) به میزان ۵/۶٪ در گاوهای شهرستان زاهدان تعیین شده است (۴). تاکنون مطالعات اندکی در باره آلودگی تیلریا در گاوهای ایران با روش ملکولی صورت گرفته است. عزیزی و همکاران (۱۳۸۶)، ۱۴۰ راس گاو بالای ۱ سال را در شهرکرد از نظر آلودگی به تیلریا آنولاتا مورد بررسی قرار دادند. میزان آلودگی به تیلریا آنولاتا با روش PCR به میزان ۴۰٪ تعیین نمودند (۸). حقوقی راد و همکاران در سال ۱۳۹۰ در ۷/۵٪ گاوهای استان گلستان آلودگی به تیلریا آنولاتا را مشخص نمودند (۱۳).

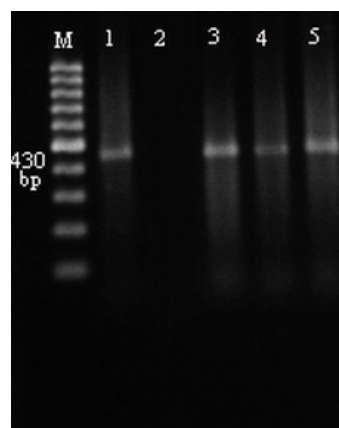
در مطالعه حاضر، هیچگونه آلودگی بانزیا بی با روش میکروسکوپی و مولکولی مشاهده نشد. در ایران اطلاعات کمی درباره میزان آلودگی بانزیایی در گاوهای مناطق مختلف ایران وجود دارد. موثقی (۱۳۶۴) میزان شیوع بانزیا بایجمینا و بانزیا بویس در

بحث

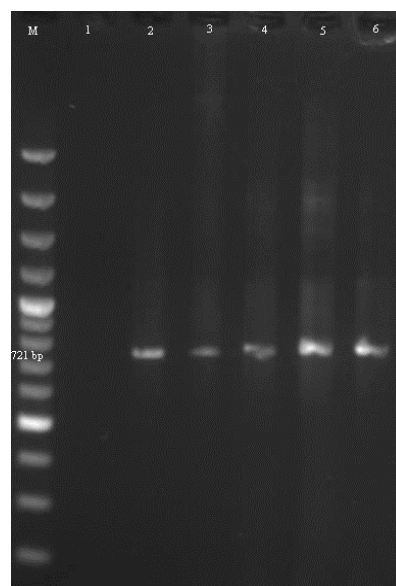
در مطالعه حاضر آلودگی به تیلریا آنولاتا در ۴٪ گسترش‌های خونی تهیه شده از گاوهای به ظاهر سالم شهرستان یزد (منطقه کویری) دیده شد و همچنین با روش ملکولی این آلودگی به ترتیب در ۱۱٪ گاوهای به ظاهر سالم شهرستان یزد، ۱٪ در شهرستان تربت جام و ۳٪ در شهرستان تنکابن گزارش گردید. در ایران عمده مطالعات میکروسکوپی و ملکولی درباره آلودگی تیلریا آنولاتا در گاوهای مناطق مختلف ایران انجام شده است. میزان آلودگی به تیلریا آنولاتا با روش میکروسکوپی توسط مرشدی و همکاران (۱۳۸۲) به میزان ۱۵ درصد در گاوهای شهرستان ارومیه (۳)، توسط رزمی و همکاران (۱۳۸۱-۱۳۸۲) به میزان ۲۰٪ در گاوهای شهرستان مشهد (۱۶)، توسط شاهقلیان و همکاران (۱۳۸۰) در شهرکرد به میزان ۴/۹ درصد (۲) و

در یک مطالعه ملکولی، نعمان در سال ۱۳۹۱ آلودگی به تیلریا آنولاتا در ۲۳/۹٪ و بدون آلودگی به بانریا در گاوهای شیری در استان اصفهان تعیین نمود (۱۴). اگرچه به علت نبودن کنه‌های ناقل اختصاصی، در شهرستان‌های یزد (اقلیم کویری) و تربت جام (اقلیم نیمه کوهستانی) گزارش عدم آلودگی بانریا منطقی بنظر می‌رسد ولی عدم تعیین آلودگی بانریایی از استان‌های گیلان و مازندران سؤال برانگیز است. به همین دلیل لازم است مطالعه ای با تعداد بیشتری نمونه در گاوهای این استان جهت درستی این نتیجه انجام گیرد. در بررسی‌های انجام شده در کشورهای همسایه ایران چون ترکیه و پاکستان آلودگی به بانریا بایجمینا، بانریا بویس و تیلریا آنولاتا در گاوها گزارش شده است. در ترکیه ۳۸۹ نمونه خون گاو توسط روش Reverse line blot (RLB) برای تعیین آلودگی تک یاخته‌های خونی مورد آزمایش قرار گرفتند. آلودگی به تیلریا آنولاتا در ۱/۲۸٪، بانریا بایجمینا در ۰/۷۷٪، بانریا میجور در ۰/۵۱٪ و سایر گونه‌های بانریا ۱/۲۸٪ نمونه‌های خون گاوها تعیین گردید (۷). در مطالعه دیگر در پاکستان با استفاده از تکنیک PCR، ۱۰۰ نمونه خون گاو از نظر آلودگی به بانریا و تیلریا مورد آزمایش قرار گرفتند، در این بررسی آلودگی به تیلریا آنولاتا در ۳۶ راس گاو، بانریا بایجمینا در ۱۳ راس گاو و بانریا بویس در ۷ راس گاو تعیین گردید (۱۰). با توجه به گزارش آلودگی تیلریا آنولاتا در گاوهای نمونه برداری شده در مناطق مختلف اهمیت بهداشتی تیلریوز گاوی در ایران مجدداً مورد تأکید قرار می‌گیرد و لازم است مسئولین بهداشتی کشور برنامه ریزی لازم جهت کنترل و پیشگیری بهتر بیماری انجام دهند. در این مطالعه برخلاف پاره ای از مطالعات انجام شده در ایران هیچگونه آلودگی بانریایی حتی در گاوهای مناطق

گاوهای استان گیلان با روش میکروسکوپی را به ترتیب ۴/۵۸٪ و ۱/۲۵ (۵)، ضیاپور و همکاران (۱۳۹۰) میزان آلودگی بانریایی در گاوهای استان مازندران را ۱۸/۳٪ (۱۹) و فخار و همکاران در سال ۱۳۹۱ با همین روش، در ۲/۱٪ گاوهای استان کردستان تعیین نمودند (۱۱). همچنین اخیراً فرم بالینی از آلودگی توام به تیلریا آنولاتا و بانریا بایجمینا در یک راس گاو هلشتاین به شهرستان تبریز گزارش شده است (۱).



تصویر ۱: محصول PCR در مرحله اول: M: مارکر 100 DNA جفت باز، چاهک ۱: کنترل مثبت تیلریا، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳-۵: نمونه خون مثبت



تصویر ۲: محصول PCR در مرحله دوم: M: مارکر 100 DNA جفت باز، چاهک ۱: کنترل منفی تیلریا آنولاتا، چاهک ۲: کنترل مثبت تیلریا آنولاتا، چاهک ۳-۶: نمونه‌های مثبت

7. Altay, K., Aydin, F., Dumanli, N., Aktas, M. (2008). Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Veterinary Parasitology* **158**: 295-301.
8. Azizi, H., Shiran, B., Farzaneh Dehkordi, A., Salehi, F., Taghadosi, C. (2007). Detection of *Theileria annulata* by PCR and its comparison with smear method in native carrier cows. *Biotechnology* **7**: 574-7.
9. D'Oliveira, C., Van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal Clinical Microbiology* **33**: 2665-9.
10. Durrani, A.Z., Kamal, N. (2008). Identification of ticks and detection of blood protozoa in Friesian cattle by polymerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Tropical Animal Health and Production* **40**: 441-7.
11. Fakhar, M., Hajihassani, A., Maroufi, S., Alizadeh, H., Shirzad, H., Piri, F., Pagheh, A.S. (2012). An epidemiological survey on bovine and ovine babesiosis in Kurdistan Province, western Iran. *Tropical Animal Health and Production* **44**: 319-22
12. Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M. (1996). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology* **50**: 69-81.
13. Hoghooghi-Rad, N., Ghaemi, P., Shayan, P., Eckert, B., 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 Science Journal* **12**: 317-23.
14. Noaman, V. (2012). Molecular study on *Theileria* and *Babesia* in cattle from

خزری مشاهده نگردید با توجه به تعداد نمونه‌های اندک گرفته شده در این بررسی، به طور قاطع نمی‌توان عدم آلودگی گاوها به *بابریا* را در مناطق مختلف تایید نمود، به همین دلیل نیازمند مطالعات جامع تری درباره آلودگی *بابریایی* در گاوهای مناطق مختلف ایران دارد.

منابع

۱. جوادى ممقانى، الف.، شهبازى، ع.، فلاح، ا.، خان محمدى، م.، نعمت الهى، ا.، اشرفى هلان، ج.، فرتاش وند، م.، محامى اسکويى، م. (۱۳۹۱). گزارش آلودگى توام يك راس گاو نژاد هولشتاين باتيليريا آنولاتا و بابريا بايرمينا در يکى از گاودارى‌هاى سنتى شهرستان تبريز. *مجله پاتوبیولوژى مقایسه‌ای*، جلد ۹، شماره ۳، صفحات: ۷۹۳-۷۵۹.
۲. شاه قليان، ل.، مشکى، ب.، ممتاز، ح.، سمیع پور، و. (۱۳۸۲). بررسی فراوانى تیلریوز گاوى در شهرستان شهرکرد. *مجله پژوهش و سازندگى*، جلد ۱۶، شماره ۲، صفحات: ۴۱-۴۳.
۳. مرشدی، الف.، حریداللہی، م.، دلیر نقده، ب.، توسلى، م. (۱۳۸۲). بررسی سرم شناسى عفونت ناشى از تیلریا آنولاتا در گاو به روش الایزا و مقایسه آن با مشاهدات بالینى و ریزینى. *مجله تحقیقات دامپزشکى*، جلد ۵۸، شماره ۴، صفحات ۳۱۹-۳۲۲.
۴. مظفرى، ع.، نورالهی فرد، س.، محمدى، و. (۱۳۸۶). بررسی فراوانى تیلریوز گاوى در گاودارى‌هاى شهرستان زاهدان. *مجله دامپزشکى ایران*، جلد ۳، شماره ۳، صفحات: ۶۷-۷۰.
۵. موثقی، الف. (۱۳۷۰). بررسی بابریوز در گاو و وضعیت آن در شهرستان رشت. پایان نامه جهت دریافت دکتری عمومى دامپزشکى، دانشکده دامپزشکى دانشگاه تهران. شماره پایان نامه: ۲۰۱۵.
۶. هاشمى فشارکى، ر. (۱۳۶۵). تیلریوز گاوى در ایران. چاپ اول، انتشارات موسسه واکسن و سرم سازى رازى، حصارک، کرج.

- Isfahan province, central Iran. *Journal of Parasitic Diseases* Sep: 1-3 (online).
15. Radostis, O.M., Gay, C.C., Hinchliff, K.W., Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine*. W.B. Saunders, London: 1483-1530.
 16. Razmi, G.R., Barati, F., Aslani, M.R. (2009). Prevalence of *Theileria annulata* in dairy cattle in Mashhad area, Iran. *Journal of Veterinary Parasitology* **23**: 81-3.
 17. Shayan, P., Rahbari, S. (2005). Simultaneous differentiation between *Theileria spp.* and *Babesia spp.* on stained blood smear using PCR. *Parasitology Research* **97**: 281-6.
 18. Soulsby, E.J.L. (1982). *Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. 7th Edition, Bailliere-Tindal, London: 709-41.
 19. Ziapour, S.P., Esfandiari, B., Youssefi, M.R. (2011). Study of the prevalence of babesiosis in domesticated animals with suspected signs in Mazandaran Province, north of Iran, during 2008. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10**: 712-14.

A Comparative Study on Haemoprotezoa Infection in Apparently Healthy Cattle in Different Geographical Areas of Iran Using PCR Method

Cheshti, B.¹, Razmi, G.R.^{2*}, Naghibi, A.³

1- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad

Received Date: 28 August 2013

Accepted Date: 23 September 2013

Abstract

Theileriosis and Babesiosis are the important tick-borne diseases. They are characterized by fever, anemia, and death and fall in animal production and caused a lot of economic loss in livestock industry. The aim of this study was microscopical and molecular examination of Theileria spp and Babesia spp infection in apparently healthy cattle in the desert (Yazd), semi- mountainous (Torbat Jam) and Caspian climates (Tonkabon) of Iran. In this study, 270 blood smears and blood samples with anticoagulant material were collected from healthy dairy cattle during spring and summer seasons in Yazd, Torbate Jam and Tonekabon areas. The collected samples were transferred to the laboratory, and then the blood smears were prepared and stained with Giemsa method. DNA of blood samples were extracted using a commercial kit then examined to detect Theileria and Babesia infection in healthy cattle in two stages. Theileria spp was observed in four blood smears from cattle in Yazd area, the results of PCR showed that 12 blood samples of cattle in Yazd, 1 blood sample in Torbat Jam and 3 blood samples in Tonkabon area were infected with T. annulata. Any Babesia spp infection was not detected in blood samples by microscopical and molecular examination. The obtained results indicated that the Theileria annulata infection is more important in dairy cattle in different areas of Iran.

Keywords: *Theileria, Babesia, cattle, Iran*

**Corresponding author: Razmi, G.R.*

Address: Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel:

Email: Razmi@um.ac.ir

