نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۳، تابستان ۱۳۹۳

بررسی آلودگی تیلریا آنولاتا درگاوهای کشتار شده با دو روش مقایسه‌ای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و میکروسکوپی

• حمیدرضا عزیزی
استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
• میلاد عادل (نویسنده مسئول)، • فضل الله صالحی و • احمدرضا صفیان
فارغ التحصیلان دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد
تاریخ دریافت: دیماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: خردادماه ۱۳۹۱
miladadel85@yahoo.com

چکیده

به منظور مقایسه واکنش PCR در تشخیص گاوهای بومی‌حامل تیلریا آنولاتا نسبت به روش تهیه اسمیر (گسترش نازک خون محیطی)، از اوایل اسفند ماه ۱۳۸۸ تا اواخر اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ از ۱۴۰ راس گاو بومی‌بالای یک سال ارجاع داده شده به کشتارگاه، به صورت تصادفی نمونه گرفته شد. برای این منظوراز ورید گوشی هر گاو، گسترش خونی تهیه و با الکل متانول فیکس شد تا برای رنگ آمیزی به روش گیمسا و جستجوی انگل با کمک عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری و روغن امرسیون، مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برای انجام آزمایش PCR، از ورید وداج نیز ۹ سی سی خون در لوله‌های اتوکلاو شده‌ای که حاوی ۱ سی سی بافر سیترات ۳/۲ درصد بود، جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد منتقل گردید. از ۱۴۰ نمونه مورد بررسی توسط روش PCR، ۵۶ نمونه مثبت (۴۰٪) و ۸۴ نمونه منفی (۶۰ ٪) بودند ولی در بررسی ۱۴۰ نمونه اسمیر تهیه شده، ۱۲ مورد (۸/۵۷٪) حاوی اشکال پیروپلاسمائی تیلریا آنولاتا و ۱۲۸ نمونه (۹۱/۴۳٪) عاری از اشکال پیروپلاسمائی انگل گزارش شدند. مقایسه بین دو روش PCR و تهیه اسمیردر تشخیص گاوهای حامل تیلریا آنولاتا، حاکی از اختلاف معنی دار بین این دو روش می‌باشد ($P\leq 0/005$). با توجه به نتایج بدست آمده در این بررسی، حساسیت تکنیک PCR در تشخیص حاملین تیلریا آنولاتا نسبت به روش میکروسکوپی بسیار بالاست. با توجه به شیوع بالای آلودگی نیاز به مطالعات اپیدمیولوژی و اقدامات کنترلی را آشکار می‌کند.

کلمات کلیدی:تیلریا آنولاتا، گسترش خونی، PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 103 pp: 65-69

Investigation of *Theileria annulata* infection in slaughtered of native cows by two methods of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Microscopic examination

By: Azizi, H.R.; Associate Professor of Veterinary Faculty of Shahrekord University, Aadel, M. (Corresponding Author); Graduated of Veterinary Faculty of Shahrekord University. Salehi F.A, Safian A.R. Graduated of Veterinary Faculty of Shahrekord University.

Email: Miladadel85@yahoo.com

Received: December 2011 Accepted: May 2012

In order to compare PCR technique with smear method to find out *Theileria annulata* in the cows carrier,cattle over one year was referred to the slaughter, samples were taken randomly since February 88 till May 89. We took blood from ear vein, then fixed with methanol & colored with gimsa at least we sarched for parasits under objective lenses (100x). Also for PCR,we took 9ml blood from jagular vein of each cows & added 1ml citrate buffer 3.2%, then sensed to biochemistry laboratory of Shahrekord University.From 140 samples by PCR technique:56 samples) 40%) were positive & 84 samples(60%) were negative. From 140 samples by smear method 12 samples (8.75%) were positive & 128 samples (91.43%) were negative. Comparison between PCR and detection of Asmer prepration method to detection of Theileria carrier cow, showed significant differences between two methods (P<0.005). According to the results obtained in this study, we understand that the sensitivity of PCR technique to diagnosis *Theileria annulata* carrier svery high compared to smears.Itis suggested that the epidemiological studies, and control measure be used.

Keywords: *Theileria annulata*, Smear, PCR.

مقدمه

تیلریــوز به عنوان یکی ازبیماریهای کشنده دام مطرح می‌باشــد وطبق اظهار نظر برخی ازمحققین سالانه بیش از پانصدهزار راس گاو درآفریقا دراثر این بیماری ازبین می‌روند (Robinson, ۱۹۸۲). درنواحی خاورمیانه و شبه قاره هندوجنوب شــوروی سابق و شــمال آفریقا تیلریا آنولاتا ۱عامل بیماری می‌باشد. گاوهای اروپایی نسبت به تیلریوز کاملا حساس‌اند و مرگ و میر آن‌ها در صــورت عدم درمان اختصاصی با بوپارواگون به ۴۰ تا۶۰ درصد می‌رســد (Hashemi-Fesharaki, ۱۹۹۱). بی اشتهائی، لاغری، کاهش تولید شیر، تب شدید، افزایش ضربان قلب، بزرگ شدن گره‌های لنفاوی (گاهی تا چهار برابر حد طبیعی)، یبوست یا اسهال، کم رنگی مخاطات که به سوی زردی می‌رود، که از ویژگی‌های تیلریوز ناشی از گونه آنولاتا می‌باشند (Robinson, ۱۹۸۲). تک یاخته تیلریا توســط کنه‌های ایکسودیده منتقل شده ودر فصول گرم که فصل فعالیت کنه‌ها است شیوع بیشتری دارد.

گاوهــای بهبود یافته از بیماری به مدت طولانی می‌توانند حامل بیماری باشــند که در طی این مدت تعداد اندکی از اریتروســیت‌های آلوده به اشکال پیروپلاســمائی انگل را دارا می‌باشــند. این چنین حامل‌هائــی در آلودگی از طریــق کنه‌های هیالوما ســهم مهمی‌دارند. به این دلیل اســت که تشخیص اشــکال پیروپلاســمائی تیلریا آنولاتا در حیوانات حامــل از نظر اپیدمیولوزی از اهمیت زیادی برخوردار اســت. پیدا کردن اشــکال پیروپلاسمائی انگل در گســترش‌های خونی گاوهای حامل کاری مشکل است (D'oliveira, ۱۹۹۵). البتــه اســتفاده از روش PCR تشخیــص حضور تک یاخته تیلریــا آنولاتا، را در پارزیتمی‌پایین را امکان پذیر می‌نمایــد (Almeria, ۲۰۰۱, D'oliveira, ۱۹۹۵). Kirvar و همکاران (۲۰۰۰) حساسیت PCR را تا یک انگل در میلی لیتر خون بدســت آوردند و اعلام کردند که حساســیت روش PCR صد برابر بیشتر از جســتجوی انگل در دویســت میدان میکروسکوپی در یک گسترش خونی است(Kirvar, ۲۰۰۰). با توجه به اهمیت تیلریوز و ضررهای اقتصادی ناشی از آن و همچنین نقش اساسی حاملین در ماندگاری و بقاء انگل، لذا ما بر آن شــدیم تا با مقایسه دو روش PCR و اسمیر در تشخیص حاملین انگل، گامی‌هر چند کوچک برای رسیدن به این هدف برداریم.

مواد و روش کار

ایــن تحقیق جهــت مقایســه دو روش PCR و تهیه گســترش از خون محیطی، بر روی ۱۴۰ نمونه تصادفی از گاوهای بومی‌بالای یک ســال کشتار شــده در کشتارگاه صنعتی نجف آباد و حومه در طی اســفند ۸۷ و بهار ۸۸ انجام گرفت.در کشتارگاه پس از ثبت شماره گاو، از وریدهای سطحی گوشی هر گاو گسترش تهیه و بعد از خشک شدن، توسط الکل متانول فیکس شدو بــرای رنگ آمیزی و جســتجوی انگل، به آزمایشگاه انگل شناســی دانشکده دامپزشــکی منتقل گردید. با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۴۰ دقیقه رنگ آمیزی شــد، در ادامه با اســتفاده از لنز ۱۰۰ میکروســکوپ نــوری و روغن امرســیون از نظر وجود اشکال پیروپلاسمائی تیلریا آنولاتا مورد جستجو قرار گرفتند۱۴۰ نمونه خون، از ســیاهرگ وداج ۹ ســی ســی خون در لوله‌های آزمایش اتو کلاو شــده‌ای که حاوی ۱ سی ســی بافر سیترات ۳/۲ درصد(به عنوان ضد انعقاد) بود، گرفته شــد تا برای آماده ســازی نمونه‌ها و جداسازی DNA جهــت انجام آزمایش PCR به آزمایشگاه بیوتکنولوژی منتقل گردد. نمونه‌ها DNA بوســیله فنل کلروفوم اســتخراج و در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند، تا برای تکثیر DNA و مشاهده قطعه مورد نظر بر روی ژل آماده کار باشند. نمونه‌ها DNA استخراج شده، بر اساس روش (D'oliveira,۱۹۹۵) انجام گرفت. برنامه حرارتی دســتگاه ترموســایکلر در ۳۰ ســیکل حرارتی به شــرح زیر اســت(D'oliveira, ۱۹۹۵): مرحله واسرشــت دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه ســانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله گسترش دو رشته

DNA در دمـای ۷۲ درجه سـانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله گسـترش نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه.

این تحقیق برای تکثیر ژنوم تیلریا آنولاتا از پرایمرهای N۵۱۶ و N۵۱۷ که توسـط شرکت Meta Bion آلمان تهیه شـده بود استفاده گردید. این پرایمرهـا از یـک ژن بزرگ ۳۰KD که آنتی ژن سـطحی مروزوئیت تیلریا آنولاتا را کد می‌کند استخراج شده است. پرایمرN۵۱۶ به عنوان پرایمر پیش برنـده، دارای طول ۱۷ جفت بـاز(GTAACCTTTAAAAACGT ازتوالی نوکلئوتیـدی ۵′به۳′) و پرایمـر N۵۱۷ (GTTACGAACATGGGTTT ازتوالـی نوکلئوتیدی ۵′بـه۳′) به عنوان پرایمر برگشتـی دارای طول ۱۷ جفت باز در آزمایش‌های تکثیر مورد اسـتفاده قـرار گرفتند (D'oliveira, 1995).

مواد مورد نیـاز جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز(D'oliveira,۱۹۹۵) شامل موارد زیر است:

Taq buffer با غلظت X۱۰ با غلظت نهایی X۱ به میزان ۵ µl برای هر نمونه، dNTPs با غلظت ۱۰ mM با غلظت نهایی ۲۵۰ µl به میزان ۲۵/۱µl بـرای هر نمونه،MgCl۲ با غلظت mM۲۵ با غلظت نهایی ۵/۱Mm به میزان ۳ µl برای هر نمونه،Primer Mix با غلظت µM۴ با غلظت نهایی۶M µ ۱/ به میزان ۳ µl برای هر نمونه،Taq DNA Polymerase با غلظت ۵µl/u با غلظت نهایی۵µ۲/بـه میزان ۵/ µl برای هر نمونـه،DNA با غلظت ۲۰ng با غلظت نهایی ۱۰۰ng به میزان ۵ µl برای هر نمونه،ddH۲O به میزان ۲۵µl/۱۵برای هر نمونه،حجم نهائی مواد مورد نیاز ۵۰ µl می‌باشد.

جهـت تفکیک فراورده‌های حاصـل از تکثیـر PCR، از ژل آگارز ۱,۲ درصـد در بافرTBE (۰,۵X) اسـتفاده شـد و DNA Ladder (۱۰۰bp) به عنوان مارکر اسـتاندارد مورد استفاده قرار گرفت. ۳/۷۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید را بعد از ذوب کامل ژل و خنک شـدن بـه آن اضافه می‌کنیم. در پایان از ژل الکتروفورز در زیر نور UV، توسط دستگاهUVI tec مدل BTS-MS.۲۰عکس برداری شد و نتیجه آزمایش قرائت گردید.

وجـود قطعهDNA bp ۷۲۱، در الکتروفـورز نشان دهنده نمونهDNA آلـوده به انگل بود، حـدود۰/۰۰۰۳۸ درصد پارازیتمیا کـه برابر با ۱۹انگل درهر سـی سـی تشخیص داده شد.نتایج به دسـت آمده از هر دو روش به صورت توصیفی گزارش گردیده و با تست آماری مک نما با یکدیگر مقایسه می‌گردند.

نتایج

۱۴۰ اسـلاید رنگ آمیزی شـده توسط گیمسـا، از نظر وجود اشکال پیروپلاسـمائی انگل مورد جسـتجو قرار گرفتند. در این بررسـی اشـکال پیروپلاسمائی انگل در ۱۲ نمونه از ۱۴۰ نمونه مورد آزمایش، مشاهده شد شکل (۱)،جدول (۱).

در قرائت نتایج بدسـت آمده مشخـص گردید که ۵۶ مورد از ۱۴۰ نمونـه خـون مورد آزمایـش، دارای قطعه مـورد نظر با انـدازهbp۷۲۱ بودند جدول(۱).مقایسـه آماری دو روش PCR و تهیه گسـترش خونی در تشخیـص حاملیـن تیلریـا آنولاتا بـا کمک آزمون آمـاری مک نمار حاکـی از معنـی دار بودن اختـلاف ایـن دو روش در تشخیص حاملین می‌باشـد(P≤۰/۰۰۵). تعـداد نمونه‌های مثبت به دسـت آمده از هر دو روش در جدول(۲) آمده اسـت. در بررسـی عکس‌های گرفته شده از ژل الکتروفورز قطعات DNA تکثیر یافته‌ای که بین محدوده bp۷۰۰ و bp۸۰۰ از سایز مارکر قرار گرفته بودند به عنوان موارد مثبت و قطعات تکثیر یافته تصادفـی که خارج از این محدوده وزنی بودند بـه عنوان موارد منفی ثبت شدند شکل (۲).

جدول(۱): مقایسه دو روش گسترش خونی و PCR در شناسائی موارد حامل تیلریا آنولاتا در ۱۴۰ نمونه خون تهیه شده از گاوهای کشتاری

تشخیص	گسترش خونی		PCR	
درصد - تعداد	درصد	تعداد نمونه مثبت	درصد	تعداد نمونه مثبت
مثبت	۸/۵۷	۱۲	۴۰	۵۶
منفی	۹۱/۴۳	۱۲۸	۶۰	۸۴
جمع	۱۰۰	۱۴۰	۱۰۰	۱۴۰

بحث

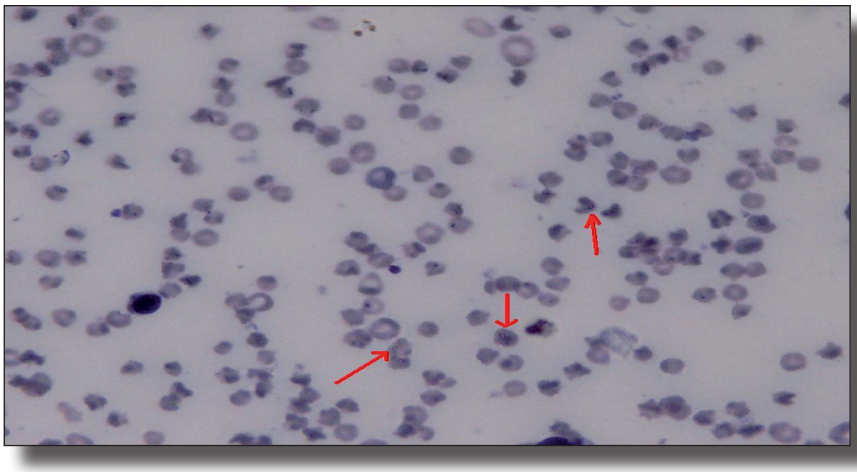
در این بررسـی در گسـترش خونی ۵ /۸٪ گاوهای بومی‌واجد اشـکال پیروپلاسـمایی بود در حالیکه ۴۰ ٪ موارد در آزمایش PCR واکنش مثبت نشان دادند. در جهان مطالعات وسیعی در مورد تشخیص موارد حامل تیلریا آنولاتا به روش‌های تهیهٔ اسـمیر،IFA و PCR انجام شـده است ولی هیچ کدام حساسیت بالاتر از روشPCR را نداشته اند. یافته‌های این پژوهش نیز با یافته‌های سایر محققین در رجحان روشPCR نسبت به روش اسمیر در تشخیص گاوهای حامل این تک یاخته تطابق دارد. D'oliveira و همکاران (۱۹۹۵) روی چهـار سـویه تیلریا آنولاتا کـه از ترکیه، اسـپانیا، پرتقال و موریتانیا جمع‌آوری شده بودند مطالعه کردند. آنان پس از آلوده سازی ۹۲ گوسـاله که تقریبا یک سال سن داشـتند به مقایسه روشهای تهیه اسمیر، IFA وPCR در تشخیـص مـوارد حامـل پرداختند. از ۹۲ گوسـاله مورد مطالعه ۲۲ درصد با روش گیمسـا و۴۰ درصد با روش IFA مثبت شناخته شـدند در حالی که آزمـونPCR آن‌ها ۷۰ درصد را مثبـت نشان می‌داد. Kirvar و همکاران (۲۰۰۰) با اسـتفاده از یک ژن بزرگ کدکنندهٔ آنتی ژن سـطحی مروزوئیت حساسیت روش PCR را تا یک انگل در سی سی خون

جدول(۲): تعداد نمونه‌های مثبت به دست آمده از دو روش گسترش خونی و PCR

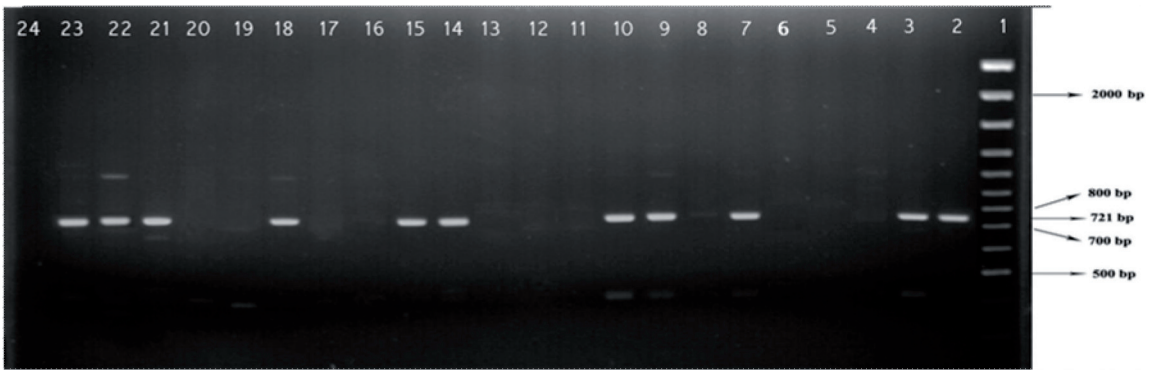
	تعداد مثبت	درصد	تعداد کل
گسترش خونی	۱۲	۸/۵۷	۱۲۰
PCR	۵۶	۴۰	۱۲۰
جمع	۶۸	۲۸	۲۴۰

بدست آوردند. آنان اعلام کردند که حساسیت روش PCR صد برابر بیشتر از جستجوی انگل در دویست میدان میکروسکوپی به روش تهیه اسمیر است.Roy و همکاران (۲۰۰۰) با اخذ ۵۰ نمونه خون از گاوان بومی، به بررسی آنان از نظر وجود تک یاخته تیلریا آنولاتا توسط دو روش PCR توسط یک ساب یونیت کوچک RNA ریبوزومال و مشاهده میکروسکوپی گسترش خونی پرداختند. نتیجه آنکه تعداد ۴۲ نمونه از ۵۰ نمونه مورد آزمایش PCR، مثبت بودند و در روش مشاهده مستقیم ۸ نمونه مثبت اعلام شد. نتایج آن‌ها برتری واکنش PCR نسبت به اسمیر را نشان داد.

Dumanli و همکاران (۲۰۰۵) بعد از اخذ ۱۵۶۱ نمونه خون از گاوهای نژادهای مختلف ۱۱ شهر مناطق شرقی ترکیه به مقایسه ۳ روش مختلف تشخیص آلودگی به تیلریا آنولاتا که شامل روشهای تهیه اسمیر، IFA و PCR بود پرداختند. بطوریکه از ۱۵۶۱ نمونه در روش PCR تعداد ۵۹۰، در IFA تعداد ۵۲۶ و در تهیه اسمیر تعداد ۲۹۳ نمونه مثبت بودند. نتایج آن‌ها نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت بین روش‌های تشخیصی بود و حساسیت بالای PCR را نسبت به روش مشاهده مستقیم نشان می‌داد.. Martin Sanches و همکاران (۱۹۹۹) با اخذ ۲۱۴ نمونه خون از گاوان مناطق مختلف اسپانیا به مقایسه سه روش تشخیصی تهیه اسمیر، IFA و PCR در تشخیص تک یاخته تیلریا آنولاتا پرداختند. نتایج بدست آمده حاکی از این بود که حساسیت روش تشخیصی PCR (۷۸/۴ درصد) نسبت به IFA (۶۹/۸۶ درصد) و تهیه اسمیر(۲۶/۶۲ درصد) بسیار بالاتر است. Almeriaو همکاران (۲۰۰۱) به مطالعه‌ای اپیدمیولوژیک به منظور تعیین میزان آلودگی گاوان بومی‌منطقه مینویکا به روشPCR و گسترش خون محیطی پرداختند. ۹۴ درصد گاوان مورد مطالعه به گونه‌های مختلف تیلریا آلوده بودند که از این آمار ۴۸/۳ درصد آن‌ها به تیلریا آنولاتا آلوده بودند. آن‌ها نتیجه گرفتند که استفاده از روش PCR در تعیین میزان آلودگی به



شکل (۱): اشکال پیروپلاسمائی تیلریا آنولاتا در اسمیر تهیه شده و رنگ آمیزی شده توسط گیمسا



شکل (۲): وجود قطعهDNA bp ۷۲۱ در الکتروفورز نشان دهنده آلودگی به تیلریا انیولاتا می‌باشد.

باند شماره ۱ شناساگر،باندهای ۲۲،۲۱،۱۸،۱۵،۱۴،۱۴،۱۰،۹،۷،۳،۲ و ۲۳ مثبت‌اند و باندهای ۲۰،۱۹،۱۶،۱۷،۱۳،۱۲،۱۱،۶،۵،۴و ۲۴ منفی اند.

گونه‌های مختلف تیلریا در مقایســه با روش تهیه اســمیر بسیار دقیق تر و مؤثرتر اســت.وجود حاملین بدون علامــت بالینی در یک ناحیه و تشخیص آن‌ها می‌تواند در براورد میزان شــیوع و وضعیت ایمنی دام‌ها بســیار مؤثر می‌باشــد. در این پژوهش از ۱۴۰ نمونه اخذ شده از گاوهای بومی‌یک سال به بالا، تعداد ۵۶ نمونه حامل تیلریا آنولاتا بودند که حاکی از شــیوع بالای این بیماری می‌باشد.

منابع مورد استفاده

[1] Almeria, S., Gutierrez, J. F., Estrada, P. A., Ortuno, A., Ferrer, D. and Castella, J.

(2001). Bovine piroplasms in minorca (balearic islands, spain): A comparison of PCR-based and light microscopy detection, Vet, Parasitol, Vol , 20, No, 3 pp:249-259.

[2] D'oliveira, M., Vander, w. M., Miguel, A., Habela, M., Jacquiet, P. and Jongejan, F.(1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier Cattle by PCR, J, Clin, Microbiol, Vol , 33 No,10. pp: 2665-2669.

[3] Dumanli, N., Aktas, M., Cetinkaya, B., Cakmak, A., Koroglu, E., Saki, C. E., Erdogmus, Z., Nalbantoglu, S., Ongor, H., Simsek, S., Karahan, M. and Altay, K.(2005). Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey, Vet, Parasitol, Vol , 127 No,1. pp: 9-15.

[4] Hashemi, F. R. (1991). Chemotherapeutic value of paravaqoune and buparvaqoune against *Theileria annulata* infection of cattle, Res, Vet, Sci, Vol ,50. pp:204-207.

[5] Kirvar, E., Ilhan, T., Katzer, F., Hooshmand, R. P., Zweygarth, E., Gerstenberg, C., Phipps, P. and Brown, C. G. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR, Parasitol, Vol , 120 No,3. pp:245-54.

[6] Martin, S. J.,Viseras, J., Adroher, F.J. and Garcia, F., P. (1999). Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileri annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies, Parasitol, Res, Vol , 85, No,3. pp:243-245.

[7] Robinson, P. M.(1982). *Theileria annulata* and it's transmission: a review", Trop, Anim, Health, Prod, Vol , 14. pp:3-12.

[8] Roy, K.C., Ray, D., Bansal, G.C. and Singh, R.K.(2000). Detection of *Theileria annulata* carrier cattle by PCR, Indian, J, Exp, Biol, Vol , 38 No, 3). pp: 283-284.