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

نگاهی به ایمونولوژی و واکسن‌های تولید شده بر علیه تیلریوز گاوی

• **غلامرضا حبیبی (نویسنده مسئول)**
استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **رضا هاشمی‌فشارکی**
استاد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
تاریخ دریافت: اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۹۲
Email: g.habibi@rvsri.ac.ir

چکیده

تیلریوز گرمسیری بیماری انگلی ناشی از عفونت سلول‌های میلوئیدی (منوسیت و ماکروفاژ) و لمفوئیدی (لمفوسیت‌های B) به تک یاخته تیلریا آنولاتا بوده و در مرحله‌ای موجب آلودگی گلبول‌های قرمز خون نیز می‌شود. بیماری بوسیله کنه‌های جنس هیالوما منتقل شده و موجب عوارض گسترده‌ای از تب و کم خونی مختصر تا درگیری شدید اعضا لمفاوی بدن شده که می‌تواند در نژادهای حساس تلفاتی نیز بهمراه داشته باشد. با توجه به زندگی اجباری درون سلولی تک یاخته، سیستم ایمنی سلولی تنها بازوی موثر و محافظت کننده بدن در برابر تیلریا می‌باشد و ایمنی هومورال با تولید آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه اشکال اسپوروزوایت و مروزوایت‌های آزاد تنها قادر به کاهش قدرت عفونت زائی تیلریا می‌باشد. در مقابل، پاسخ ایمنی سلولی با فعالیت مجموعه‌ای از سلول‌های NKC، T و ماکروفاژها و مشتقات آنها نظیر اینترفرون گاما و TNF-α و بخصوص لمفوسیت‌های T CD8+ بخوبی در برابر شیزونت درون سلولی و سلول‌های آلوده به تیلریا پاسخ داده و موجب مرگ سلول‌های آلوده می‌شوند و با تولید خاطره ایمنی از بروز دوباره بیماری جلوگیری بعمل می‌آورد. البته نقش ایمنی طبیعی یا ذاتی همچون عوامل مکمل و سلول‌های بیگانه خوار، بخصوص در مراحل اولیه عفونت از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به حضور تیلریا و کنه ناقل بیماری در ایران و از طرفی وجود آلودگی در حیوانات اهلی و وحشی حامل تک یاخته که موجب بومی‌کردن بیماری شده‌اند تلاش‌هایی بمنظور تولید واکسن در بسیاری از کشورها منجمله ایران صورت گرفته است. واکسن‌های نوترکیب متنوعی بر علیه آنتی ژن‌های مربوط به مراحل مروزوایت و اسپوروزوایت بصورت آزمایشی تهیه شده است که در بررسی‌های صحرائی موفقیت‌هائی نسبی بهمراه داشته اند. در حال حاضر واکسن زنده تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا با فناوری کشت سلول‌های آلوده به شیزونت، قدرت محافظت کنندگی و پاسخ CTL قوی که دارد براساس تجربیات نزدیک به چهار دهه واکسیناسیون ملی در ایران و همچنین توصیه مراکز بین المللی نظیر OIE و FAO جهت ایمن سازی فعال گاوهای نژاد حساس و دو رگ بهترین گزینه می‌باشد.

کلمات کلیدی: تیلریوز، تیلریا آنولاتا، ایمنی، واکسن زنده تخفیف حدت یافته، واکسن نوترکیب

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 103 pp: 70-79

A Glance at the Immunity and Vaccines against Tropical Theileriosis

By: Habibi GR., *Assistant Professor of Razi vaccine and serum research institute, Karaj (Corresponding Author);*
Hashemi-Fesharki. R.; *Professor of Razi vaccine and serum research institute, Karaj*
Email: g.habibi@rvsri.ac.ir
Received: April 2013 Accepted: September 2013

Tropical Theileriosis is caused by infection of bovine myeloid mononuclear cells (Monocytes and macrophages) and lymphoid cells (B lymphocytes) as well as red blood cells by the protozoan parasite *Theileria annulata*. The disease is transmitted by ticks of the genus *Hyalomma*. The clinical signs of theileriosis in stages appear from mild symptoms to serious, including fever and anemia to severe involvement of lymphoid organs that can cause death. The cellular immunity is a main part of effective and protective against *Theileria* infection as an intracellular protozoan, but the humoral immunity with specific antibody had a neutralizing effect directed against extracellular sporozoites and merozoites. But the adaptive cell-mediated immunity is driven by activation of T cells, macrophages and natural killer cells (NKC) and their derivatives like as IFN-gamma and TNF-alpha can respond to schizont infected cells, particularly CD8+ T cells kill these infected cells and remain as memory T cells for the next parasite challenge. However, the innate immune response such as the complement system and phagocytic cells is believed to play an important role in protecting against bovine theileriosis especially during primary stage of *Theileria* infection. Iran as a sub-tropical region and the *Hyalomma* spp. vector for transmission of the *Theileria annulata* make the Theileriosis as an endemic disease. The circulating *Theileria* parasites in carrier domestic and wild ruminants, and tick infestation make Theileriosis more difficult to control, therefore many efforts have been performed for producing the efficient bovine theileriosis vaccine. The recombinant candidate vaccines have been produced based on the merozoite and sporozoite stages of the protozoa and examined experimentally with partially success in the field. However, live attenuated *Theileria annulata* with cell culture methodology induced a strong, antigen-specific CTL activity for recognition by schizont antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. Based on nearly four decades of our practical experiences on vaccination in Iran and the World Organisation for Animal Health (OIE) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) recommendations, the live attenuated vaccine is recommended as evidence-based strategies to control *T. annulata* infection by active immunization of susceptible exotic cattle and their cross-breds.

Keywords: Theileriosis, *Theileria annulata*, immunity, live attenuated vaccine, recombinant vaccine

مقدمه

تـک یاختـه تیلریا آنولاتا (در گذشـته تیلریا دیسـپار) عامـل تیلریوز گرمسیری(Tropical Theileriosis) است که بوسیله کنه‌های جنس هیالوما به گاو منتقل می‌شـود (۶۰). تیلریوز، بیمـاری لمفوپرولیفراتیو انگلی حاد و گاه کشنده‌ای است که حاصل عفونت گلبول‌های سفید و قرمز به تک یاخته تیلریا آنولاتا اسـت (۴۶). تیلریوز در نواحی وسـیعی از مناطق حاره و نیمه حاره‌ای نیمکره شمالی گزارش شده که شامل مناطقی از جنوب اروپا، شمال افریقا، خاورمیانه، هند تا شرق دور (چین) است. تخمین زده می‌شود حدود ۲۵۰ میلیون گاو در جهان در خطر ابتلا به تیلریوز باشند. نشانه‌های بیماری شامل تب، تورم غدد لمفاوی، زردی و کاهش تولید بوده که با تهیه گسترش خونی و مشاهده اجرام داخل گلبول قرمز خون (فرم اریتروسـیتی) تشخیص صورت می‌گیرد (۴۰). چنانچه درمان موثری صورت نگیرد تلفات در گاوهای وارداتی تا ۹۰ درصد بسته به سویه تک یاخته و حساسیت حیوان روی خواهد داد (۳۲ و ۵۲). دو گونـه تیلریـا آنولاتـا و پاروا در گـاو از اهمیت بیشتری برخوردارند که بیشترین خطر و آسیب را به گلبول‌های سفید وارد می‌کنند و در مقابل گونه‌های کم خطر تیلریا اورینتالیس در گاو و تیلریا اکوئی در اسب بیشتر به گلبول‌های قرمز خون تمایل دارند (۴۹ و ۷۲).

تاثیـر هـر دو گونه تیلریا آنولاتا و پاروا بر صنعـت دامپروری و تولیدات دامی‌قابل توجه اسـت. علاوه بر پراکندگی جغرافیائـی و نوع کنه‌های ناقل، تفاوت‌هائی در شـدت بیماریزائی دو گونه نیز وجود دارد بطوریکه تیلریا پاروا تلفات بیشتری نسبت به تیلریا آنولاتا ایجاد می‌کند (۵۲).

در چرخه زندگی تیلریا، برخی از شیزونت‌ها در لکوسیت‌ها به مروزوایت تمایز پیدا می‌کنند که پس از رها شـدن از سـلول میزبان به اریتروسـیت‌ها حمله ور شده و اشکال داخل گلبول قرمز انگل شکل می‌گیرد که این مرحله برای کنه عفونت زا است. آلودگی گلبول‌های قرمز خون به فرم اریتروسیتی تیلریـا نهایتـاً در دام میزبان موجب کم خونی (Anemia) می‌شـود. پس از ۴-۳ هفته از شروع عفونت تلفات ممکن است روی دهد که البته در نژادهای حساس وارداتی یا اصیل احتمال این پدیده نسبت به حیوانات بومی‌و دو رگ بیشتر اسـت. شـدت پارازیتمی(درصد آلودگی گلبول‌های قرمز خون) بطور معمـول در گاوهـای اصیل بیش از ۶۰ درصد، درگاوهـای دورگ ۴۵ درصد و در گاوهـای بومی‌بـه ۲۵ درصد می‌رسـد (۳۲). گاوهای شـیری نژادهای اروپائی بدلیل ظرفیت تولیدی بالائی که دارند علیرغم آسیب پذیری شدید به تیلریوز، جهت توسعه صنعت دامپروری به مناطق آندمیک وارد شده‌اند که در اینصورت ضروری است برنامه‌های کنترلی مناسبی جهت نگهداری آنها اتخاذ

گردد. در آلودگی‌های شـدید حتی گاوهای بومی(Zebu) نیز از خسارات و تلفات بیماری در امان نیسـتند (۴۹). در هـر حال گاوهایی که از بیماری نجات پیدا می‌کنند حامل تعدادی تک یاخته به اشکال شیزونت و فرم‌های اریتروسیتی هستند که می‌توانند مدت‌های طولانی حتی تا سال‌ها در بدن حیوان باقی بماننـد (۲۱). این آلودگی خفیف که بدون نشانه‌های بیماری می‌باشد فقط موجب تبدیل حیوان آلوده به شکل حامل (Carrier) می‌شود. در این موارد تشخیص میکروسـکپی آلودگی بسیار مشکل و گاه غیرممکن بـوده ولی روش‌هـای جدید تشخیصی نظیر آزمایش‌هـای ملکولی (PCR) می‌تواند به تشخیص آلودگی در این حیوانات کمک کنند (۱۷، ۲۲، ۴۸، ۶۱ و ۶۲) در هر صورت این حیوانات می‌توانند منبع آلودگی برای کنه‌های ناقل واقع شوند و بدین ترتیب چرخه زندگی انگل ادامه پیدا می‌کند.

بـا مشاهده حیوانات بهبود یافته از تیلریوز و مقاومت آنها در آلودگی مجدد این موضوع مورد توجه قرار گرفت که ایمنی می‌تواند بطور اکتسـابی بوجود آمده و امکان ایجاد ایمنی فعال میسـر اسـت. اصولاً هر دو سیستم ایمنی هومورال و سـلولی در مواجهه با عامل تیلریوز فعال شـده بطوریکه ایمنـی هومورال با تولیـد آنتی بـادی برعلیه تمامی‌مراحـل مختلف تک یاختـه فعالیت کرده هر چند تنها آنتی بادی‌های تولید شـده بر علیه فرم اسـپوروزوایت تک یاخته دارای نقش محافظتی بوده و موجب خنثی کردن این مرحله از تیلریا می‌شـود در حالیکه سـایر آنتی بادی‌های تولید شـده مشخص شـده که نقش موثری ندارند. در مقابل، ایمنی سـلولی با فعالیت گروهی از سـلول‌ها بخصوص لمفوسـیت‌های T، موجب ظهور پاسخ ایمنی قوی و محافظت کننده‌ای برعلیه سـلول‌های آلوده به تیلریا می‌گردد (۵۵). بازوی دیگر سیسـتم ایمنی عبارت است از ایمنی اولیه یا ذاتی که علاوه بر ایمنی اکتسـابی، نقش مهمی‌در کنترل و محافظت از تهاجم تیلریا بویژه در مراحل اولیه عفونت دارد (۱).

بـا گذشـت بیش از یک قـرن از کشف تک یاخته تیلریـا، تحقیقات گسـترده‌ای در اسـتفاده از روش‌های مختلف ایمن سـازی بر علیه تیلریوز گـاوی بمنظور کنتـرل و پیشگیری از تیلریوز انجام شـده اسـت (جدول ۱). در گذشـته، روش‌های تلقیح خون آلوده به تیلریا و سـپس روش‌های آلوده سـازی و درمان همزمان تا تولید واکسن‌های کشت سلولی همگی از تلاش‌هـای محققین در کنترل بیماری در مناطق آندمیک بوده که تاکنون روش بهـره گیری از واکسـن‌های زنده تخفیف حـدت یافته بهترین روش توصیه شـده از سوی OIE می‌باشد (۴۵ و ۵۲). علاوه براین، سایر روش‌ها مانند اسـتفاده از واکسـن‌های نوترکیب ضد کنه، آنتی ژن‌های گرفته شده از مراحل اسـپوروزوایت، مروزوایت و اخیراً آنتی ژن‌های ماکروشیزونت تک یاخته در مراحل اولیه تحقیقاتی و بررسی‌های صحرائی بوده، بطوریکه هدف از این تحقیقات تولید واکسنی موثر، بی ضرر و ارزان بوده که موجب افزایش سطح بهداشـت دام و نهایتاً تولید هر چه بیشتر محصولات دامی‌گردد. در این مطالعه نگاهی کوتاه به جنبه‌های مختلف ایمنی شناسـی در تیلریوز و تلاش‌های صورت گرفته در تحقیقات مربوط به تولید واکسـن تیلریوز شده است.

ویژگی‌های زیست شناختی و سلولی تیلریا

گونه‌هـای تیلریا بر خلاف سـایر تـک یاخته‌های اپی کمپلکسـا در سیتوپلاسـم سلول میزبان بطور آزاد زندگی کرده و در خارج از واکوئل‌های آندوپلاسـمی‌قرار دارند. ورود تیلریا به سلول میزبان بشکل آندوسیتوز بوده و از طریق رسپتورهای سلولی انجام می‌گیرد ولی با شروع تهاجم تک یاخته به سلول، غشاء آندوزوم بتدریج از بین رفته و انگل بطور آزاد در سیتوپلاسم مستقر می‌شود (۱۹).

سلول‌های هدف برای دو گونه تیلریا آنولاتا و پاروا متفاوت بوده بطوریکه گونه آنولاتا سلول‌های دارای MHC کلاس دو که شامل رده میلوئیدی شامل منوسیت‌ها و ماکروفاژها و رده لمفوئیدی شامل لمفوسیت‌های B هستند را آلوده می‌کند. در حالیکه تیلریا پاروا موجب عفونت هر دو لمفوسـیت‌های T و B می‌شـود ولی تیلریا آنولاتا نسـبت به گونه پاروا بیشتر به لمفوسیت B میل به تهاجم دارد (۶۴).

آلودگـی سـلول میزبان به تـک یاخته تیلریا موجب تغییر سـلول و تکثیر سـریع و فزاینده سـلول‌های آلوده شده بطوریکه در سرتاسر سیستم لمفـاوی بدن پراکنده شـده و منجر به هیپرپلازی و نهایتاً تخریب شـدید

جدول ۱- روش‌های کنترل و پیشـگیری از تیلریوز. مراحلی از تک یاخته و یا کنه ناقل که حسـاس به عامل کنترلی می‌باشـند، عامل موثر بکار رفته، میزان تاثیر روش اتخاذ شده بهمراه محدودیت‌های موجود در روش کنترل و پیشگیری از تیلریوز بیان شده است (۵، ۷، ۱۴، ۳۲، ۳۳، ۴۲، ۴۶، ۴۹، ۵۲، ۵۹ و ۶۹).

روش کنترل و پیشگیری	مرحله مورد هدف	عامل موثر کنترل یا پیشگیری	تاثیر روش	محدودیت های روش انتخابی
درمان داروئیChemotherapy	تمامی اشکال مختلف تک یاخته تیلریا	ترکیبات پارواکون و بوپارواکون	۶۰ تا ۸۰ درصد در مراحل اولیه بیماری	قیمت دارو بالا و تاثیر آن در اواخر بیماری به نسبت کمتر می شود
سموم ضد کنه Acaricide	کنه های ناقل در جایگاه و متصل به بدن دام	ترکیبات مختلف Acaricides	موجب کاهش جمعیت کنه می شود	موجب مقاومت در کنه شده، نیاز به برنامه ریزی و سازمان دهی اجرائی داشته و باعث آلودگی محیط زیست می شود
واکسن ضد کنه Anti-Tick Vaccine	کنه های متصل به دام	آنتی ژن نوترکیب حاصل از آنتی ژن های روده کنه	موجب کاهش جمعیت کنه می شود	تاثیر محدود و نیاز به استفاده از سایر روش های کنترلی دارد
درمان و آلوده سازی همزمان Chemoprophylaxy (infection and Treatment Method)	اسپوروزوایت تیلریا پاروا	آلودگی کنترل شده و داروی تزریق شده اکسی تتراسیکلین تاخیری	در برابر سویه های هومولوگ مطلوب	پوشش ایمنی محدود به سویه های هومولوگ می باشد
واکسن زنده تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا	تمامی مراحل تیلریا	شیزونت تخفیف حدت یافته	بیش از ۹۵ درصد قدرت محافظت کنندگی دارد	نیاز به زنجیره سرد دارد
واکسن های نوترکیب Rcombinant Vaccines	اسپوروزوایت و مروزوایت	SPAG-1, p67, Tams-1	حداکثر ۵۰ درصد محافظت کننده است	تاثیر محدود دارد

بافت‌های لمفوئیدی می‌شـوند. تغییر یا ترانسفورمه شدن سلول میزبان در عفونـت تیلریا فرآیندی پیچیده بوده و بنظر می‌رسـد ژن‌های متعددی در آن نقش داشـته باشـند. تک یاخته تیلریا با تنظیم مسـیرهای انتقال پیام (Signal Transduction) موجب تسـریع فرآیند تکثیر سـلولی شـده و از طرفی مسـیرهای مرگ سـلولی یـا Apoptosis را مهار می‌کنـد (۱۶). از سـازوکارهای این فرآینـد می‌توان به ملکول‌های متصل شـونده به DNA اشاره داشت (DNA binding molecule) که نقش تنظیمی‌در بیان ژن‌های سلول میزبان پستاندار دارند این ملکول‌ها از شیزونت تیلریا به هسته سلول میزبان وارد می‌شوند (۱۶، ۶۶ و ۶۷).

سـلول‌های آلوده به شیزونت تیلریا را می‌توان در شرائط آزمایشگاهی براحتی کشت داد و طی پاساژهای مکرر به رده سلولی تخفیف حدت یافته دسـت یافت که در تولید واکسـن موثر در برابر تیلریـوز حاد جهت ایمن سازی گاوهای حساس می‌توان از آن استفاده کرد (۱۰).

ایمنی در تیلریوز

پاسـخ ایمنـی بدن میزبان بر علیـه تیلریا در مراحـل اولیه عفونت از طریق سـاز و کارهای ایمنی ذاتی و سـپس با فعال شدن پاسخ‌های ایمنی اختصاصی یا اکتسـابی شـکل می‌گیرد. پاسخ ایمنی اکتسـابی شامل دو بخـش ایمنی هومورال و ایمنی سـلولی اسـت. نقش مهـم و موثر ایمنی هومورال عمدتاً با تولید آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه فرم اسپوروزوایت تیلریا اسـت که موجب خنثی شـدن تهاجم انگل می‌شود. ایمنی سلولی با فعالیت لمفوسیت‌های T و محصولات آنها نظیر لمفوکین‌ها و اینترفرون‌ها پاسـخ محافظت کننده بر علیه اجرام داخل سلولی نشان می‌دهد و در دفاع از مراحل داخل سـلولی تیلریا اهمیت دارد. ایمنی سـلولی با فعال کردن لمفوسیت‌های +T CD4 و +T CD8 موجب می‌شود لکوسیت‌های آلوده به ماکروشـیزونت تیلریا با فعالیت سیتوتوکسیسیتی مورد هدف قرار گرفته و از بین بروند (۴۹ و ۵۷).

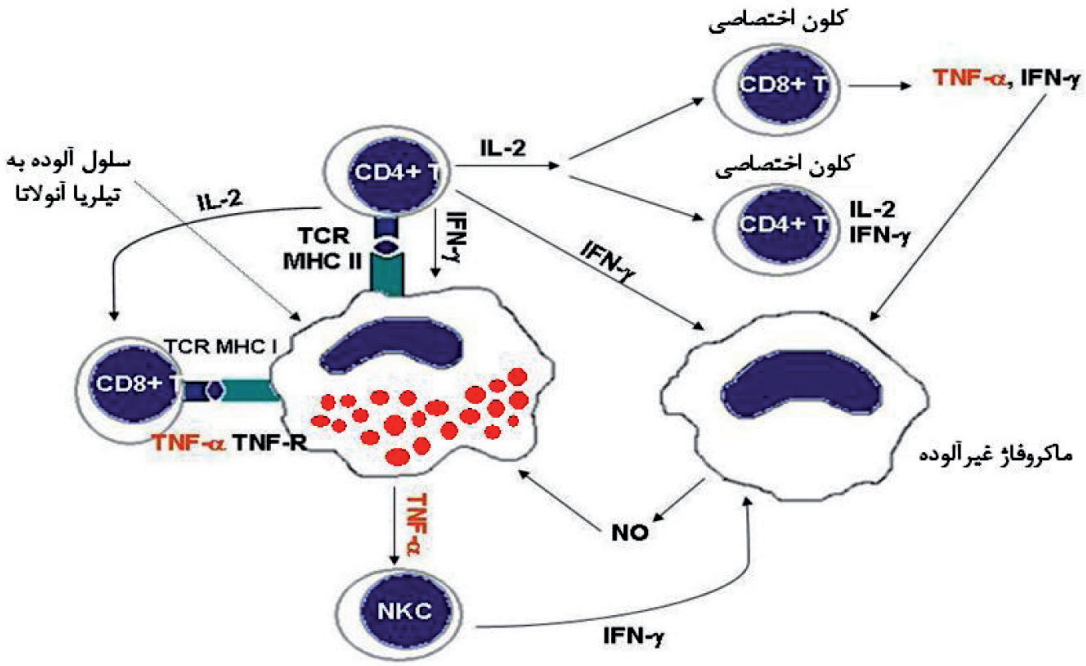
ایمنـی ذاتی در عفونت تیلریـا. ایمنی طبیعی یا ذاتی با مجموعه‌ای از عوامل دفاعی اسـت که به مقابله با اجرام بیگانـه می‌پردازد بنابراین ایمنی طبیعـی نقش مهمی‌در ایجاد مقاومت اولیه بدن در برابر عفونت تیلریا دارد. گزارشـاتی وجود دارد که نشان می‌دهد سیسـتم کمپلمـان موجب مرگ مروزوایت‌هـای آزاد نیز می‌شـود (۴). ایمنی ذاتی علاوه بـر این که دفاع اولیه بدن بر علیه میکروارگانیسـم‌ها می‌باشـد با فاگوسـیت کردن اجرام و ارائـه آنتی ژن‌های فرآوری شـده به لمفوسـیت‌های T یاور موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی اختصاصی بر علیه عوامل عفونی نیز می‌شود (۵). یکی از مهمترین عوامل در ایجاد پاسـخ ایمنی ذاتی، نقش سـیتوکین‌ها و بعبارتی مشتقات سـلولی است که عملکرد آنها بسـتگی زیاد به زمان تولید و محل عمـل آنها دارد بطوریکه تعادل آنها در مرحله عفونت بسـیار تعیین کننده اسـت. برخی از سـیتوکین‌ها با تولید تب موجب تولیـد پروتئین‌های فاز حاد شـده و برخی فعالیت ضد میکربی و اپسـونیزه کردن اجرام را بر عهده دارنـد. اینترفرون گاما با فعال کردن ماکروفاژهـای غیرآلوده موجب مهار تکثیر سلول‌های آلوده و همچنین جلوگیری از رشد سلول‌های غیر آلوده‌ای می‌شـود که با تحریک انگل دچار تکثیر شـده اند. اینترفرون گاما بوسیله لمفوسـیت‌های T و سـلول‌های NK تولید می‌شـود (۶). عـلاوه بر تولید TNF-α سـلول‌های ماکروفاژ فعال شـده با تولید NO (نیتریک اکسـاید) مانع از تهاجم اسپوروزوایت تیلریا به سلول‌های میزبان شده و بدین ترتیب مانع از تکثیر سلول‌های آلوده به انگل می‌شوند. اندازه گیری و مقایسه هر کدام از سیتوکین‌های فوق می‌تواند نشانگر فعالیت مسیر ایمنی در مواجهه با آنتی ژن‌های کاندیدای واکسـن باشد (۲۸). گیرنده‌های شبه تول (Toll like receptors یا TLRs) از مسـیرهای ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند این پذیرنده‌ها در سـلول‌های مختلف سیستم ایمنی بیان می‌شوند و نقش آنها در تشخیص بخش‌های ثابتی از اجزاء میکروارگانیسـم‌ها است که منجر به تحریک مکانیسم‌های ایمنی و پاسخ‌های بعدی شامل ترشح سیتوکین‌های التهابی و یا مرگ سـلولی (Apoptosis) می‌گردد در یک بررسـی مقایسـه ای، تفـاوت میان نژادهای حسـاس و مقاوم گاو به تیلریـوز گاوی در بیان ژن‌های مختلفی منجمله TLR 10 گزارش گردید (۴۱). در مطالعه دیگری که به بیان ژن‌های TLR 1-10 و پروتئین MyD 88 در سـلول‌هاي آلوده به تیلریا پرداخته بود اختلاف قابل توجهی در بیان ژن‌های TLRs در رده‌های آلوده به شیزونت تیلریا در پاساژهای مختلف گزارش کردند که آنرا بعنوان عاملی در بیان و توضیح حدت تک یاخته و کاهش حدت در رده سـلولی واکسـن مطرح نمودند (۲۹).

ایمنی هومورال در تیلریوز. پاسخ ایمنی هومورال تنها بر علیه مراحل خارج سلولی تیلریا یعنی مروزوایت‌های آزاد و اسپوروزوایت مطرح می‌باشد. آنتی بادی‌های اختصاصی تولید شـده بر علیه مراحل شیزونت و مروزوایت تیلریا نیز قابل ردیابی هستند ولی نقش مهمی‌در ایجاد مقاومت و محافظت بر علیه تک یاخته را ندارند (۶۹).

ایمنی سلولی در تیلریوز. ایمنی محافظت بخش بر علیه عفونت تیلریا برای اولین بار طی یک مطالعه تجربی شـرح داده شد بطوریکه Emery در سـال ۱۹۸۱ با انتقال لکوسـیت‌های مجرای لمفاوی سـینه‌ای (Thoracic duct) در دو گوسـاله دوقلوی همسـان از گوساله ایمن توانست مقاومت به تیلریـا را به حیوان غیرایمن انتقال دهـد (۵۰). مطالعات بعدی نشان داد که پاسخ گاوهای ایمن بر علیه تیلریا پاروا مربوط به فعالیت لمفوسیت‌های +T CD4 و +T CD8 اختصاصی بر علیه سـلول‌های آلوده به انگل می‌باشد (۳، ۱۱ و ۱۸). هر چند فعالیت لمفوسیت‌های +T CD8 در پاسخ ایمنی سیتوتوکسیسیتی مهم است ولی سلول‌های دیگری هم هستند که در کمک به پاسخ T CD۸+ نقش دارند. یکی از وظایف مهم لمفوسیت‌های +TCD4 یا T helper رهبری و نقش مهم آن‌ها در تحریک سلول +T CD8 است. سـلول‌های +T CD4 با تولید اینترلوکین ۲ و γ -IFN موجب القاء پاسخ CTL و پاسخ ماکروفاژها می‌شود (۷۰) (شکل ۱).

سـلول‌های ماکروفـاژ در حیوانـات بهبود یافته از تیلریـوز، در ایجاد فعالیت سیتواسـتاتیکی بر علیه سـلول‌های آلوده به تیلریا آنولاتا اثر دارند (۵۴). ایـن فعالیت با تولید و ترشـح سـیتوکین‌ها و عوامـل ضدمیکروبی TNF-α و نیتریک اکسـاید (NO) بوسـیله ماکروفاژها در پاسخ به عفونت تیلریا آنولاتا شـکل می‌گیرد. سـیتوکین TNF-a علاوه بـر نقش موثر در فعالیت سیتوتوکسیسـیتی لمفوسـیت‌های +T CD8 اثر مهارکنندگی قابل ملاحظـه‌ای روی جمعیت سـلول‌های آلوده به تیلریا نیـز دارد (۵۶ و ۷۳) (شکل ۱).

تولید γ -IFN بوسـیله لمفوسـیت‌های +T CD8 در ایمنی محافظت بخش بر علیه بسـیاری از عوامل بیماریزای درون سـلولی نظیر بسیاری از تک یاخته‌ها اهمیت داشته و نشان داده شده است (۳۹، ۵۸ و ۶۸). مرحله شیزونت در داخل سلول بوده و در دسترس آنتی بادی‌های تولید شده قرار نمی‌گیرد، بنابراین نقش ایمنی سلولی در ایجاد ایمنی محافظت کننده بسیار



شکل ۱. ایمنی در تیلریوز. در ایمنی اولیه سلول‌های کشنده طبیعی (NKC) و ماکروفاژها نقش موثر دارند ولی در ایمنی اکتسابی لمفوسیت‌های T CD4+ و T CD8+ تعیین کننده هستند. سلول‌های آلوده به تیلریا با تولید TNF-α موجب تحریک سلول‌های کشنده طبیعی NKC می‌شوند. سلول‌های NK با تولید IFN-γ و فعال کردن ماکروفاژها باعث نابودی غیراختصاصی سلول‌های آلوده به انگل می‌شوند. در تیلریوز هر دو لمفوسیت‌های B و T دارای فعالیت هستند. لمفوسیت‌های T یاور دو سیتوکین مهم IL-2 و IFN-γ می‌سازند که IL-۲ موجب تکثیر کلون‌های اختصاصی T CD8+ می‌شود و TNF-γ باعث فعال سازی ماکروفاژها و تولید نیتریک اکساید (NO) می‌گردد. نیتریک اکساید باعث از بین بردن شیزونت در سلول آلوده به تیلریا می‌شود. سیتوکین TNF-α بوسیله ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود و با جلوگیری از رشد ترفوزوایت تیلریا مانع تبدیل آن به شیزونت می‌شود و از ترانسفورم شدن سلول و تکثیر سلولی ممانعت می‌کند ضمن اینکه TNF-α در کنار IFN-γ نقش مهمی‌در کنترل عفونت به تیلریا دارد. لمفوسیت‌های T سیتوتوکسیک سلول‌های آلوده به تک یاخته را از طریق MHC کلاس یک شناخته و با مکانیسم‌هایی نظیر پرفورین موجب مرگ سلول هدف(Apoptosis) می‌شوند.

مهم می‌باشد. با توجه به استقرار درون سیتوپلاسمی‌تک یاخته تیلریا این امکان وجود دارد که ملکول‌های انگل پس از فرآیندی در کنار ملکول‌های MHC کلاس یک در سطح سلول ارائه شده و بوسیله لمفوسیت‌های CD8+ T قابل تشخیص باشند.

تست‌های ارزیابی سیستم ایمنی در تیلریوز. با توجه به فعالیت دستگاه ایمنی در هر دو بخش هومورال و سلولی بر علیه تمامی‌اشکال تیلریا تحریک می‌شوند. تست‌های سرولوژی در تشخیص آلودگی و شناسائی هر چند بطور کاملاً اختصاصی عمل نمی‌کنند ولی بهر حال تست‌های IFAT و ELISA با استفاده از آنتی ژن‌های مختلف انگل طراحی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲، ۳۶ و ۵۹). چنین تیترهای سرمی‌نشان دهنده قرار گرفتن حیوان در برابر آلودگی‌های تیلریائی بوده که در برنامه‌های ملی ردیابی بیماری مهم و ارزشمند هستند. آزمایش‌های سرولوژی تست تثبیت عناصر مکمل (CFT)، هماگلوتیناسیون، ترسیب ژل آگار(Agar gel precipitation)، ایمونوالکتروفورز و آگلوتیناسیون در بررسی‌های اپیدمیولوژی بویژه کاربرد دارد (۳۸ و ۴۳).

با توجه به نقش ایمنی سلولی و فعالیت محافظت کننده آن در برابر عفونت تیلریا و بخصوص لمفوسیت‌های سیتوتوکسیک T CD8+ و سایر عوامل موثر در ایمنی سلولی نظیر سیتوکین‌ها و اینترفرون‌ها اخیراً تست‌های بسیاری در این بخش طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است. تست جلدی تیلرین از آزمایش‌های درون تنی یا *in vivo* بوده و بر اساس واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری(DTH) بنا شده، روشی ساده و قابل استفاده برای تشخیص حیوانات ایمن از غیر ایمن می‌باشد (۳۷). تست الیزا برای اندازه گیری اینترلوکین‌های یک، دو، شش، ده، اینترفرون گاما و TNF-α مورد استفاده قرار گرفته ولی از آنجائیکه دسترسی به کیت‌های سنجش سیتوکین‌های گاوی معمولاً دشوار است این بررسی را می‌توان در سطح بیان ژن‌های مذکور انجام داد که روش مطالعه با بهره گیری از تست‌های ملکولی RT-PCR به شکل نیمه کمی‌تغییر پیدا می‌کند (۲۶ و ۴۷).

سنجش فعالیت سیتوتوکسیسیتی بمنظور اندازه گیری عملکرد اختصاصی لمفوسیت‌های T CD8+ انجام می‌شود معمولاً با استفاده از کروم رادیواکتیو (Cr51) انجام می‌گیرد. آزمایش میکروسیتوتوکسیسیتی جایگزین این تست بوده که جهت شناسائی سلول‌های سیتوتوکسیک در لمفوسیت‌های خون محیطی حیوان تازه بهبود یافته از تیلریوز استفاده شده است (۱۲). در تست‌های فوق به اندازه گیری مشتقات سلولی و عملکرد آنها پرداخته می‌شود ولی در فلوسیتومتری اساس آزمایش بر مبنای لیزر و تکنولوژی ایمونوسیتوشیمی‌طراحی شده و با استفاده از بیومارکرهای

سلولی، تشخیص دقیق فنوتیپ سلول‌های موثر در پاسخ ایمنی ممکن می‌گردد (۲۰).

واکسن‌های تیلریوز حاره ای. نخستین بار پژوهشگری بنام Theiler در سال ۱۹۱۱ نشان داد که با انتقال سلول‌های آلوده به تیلریا که از بافت‌های دام بهبود یافته از تیلریوز تهیه شده بود به گاوهای حساس می‌توان آنها را در مقابل چالش بعدی با انگل حاد تیلریا پاروا مقاوم و ایمن نمود (۴۹).

واکسن زنده تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا. با توسعه روش‌های کشت سلول‌های آلوده به انگل (۱۰ و۷۱) و همچنین روش‌های انجماد سلولی (هر دو مرحله اسپوروزوایت و سلول آلوده به شیزونت) در سال‌های ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ امکان بررسی و مطالعه روی توسعه واکسن‌های زنده فراهم شد بطوریکه بعدها مشخص شد که کشت طولانی مدت سلول‌های آلوده به تیلریا منجر به کاهش حدت تک یاخته شده و حیوانات تلقیح شده با چنین سلول‌هائی در برابر چالش بعدی با سویه حاد مقاوم می‌باشند (۱۳ و ۵۳). مکانیسم‌های موثر در کاهش حدت تیلریا مختلف بوده که می‌توان به فرضیه انتخاب کلون خاص (Clonal Selection) تغییرات ژنتیکی (Gene rearrangement) و تغییرات بیان ژن‌ها (Gene expression) در طول پاساژهای مختلف اشاره داشت که بارها این فرضیه‌ها مورد توجه و بررسی محققین قرار گرفته که در نهایت مهمترین ساز وکار مورد تائید و اتفاق در این زمینه کاهش بیان و تولید آنزیم‌های متالوپروتئیناز است (۲۴ و ۳۰).

دوز واکسن تیلریوز، حداقل تعداد سلول آلوده به شیزونت تخفیف حدت یافته تیلریا است که اولاً ایجاد عفونت کنترل شده در بدن حیوان گیرنده نموده و ایمنی محافظت کننده‌ای در برابر سویه‌های حاد وحشی یا چالش با دوزهای کشنده از اسپوروزوایت تیلریا ایجاد کند (۳۳).

ایمنی حاصل از واکسن زنده تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا که با استفاده از تلقیح رده سلولی آلوده به شیزونت تخفیف حدت یافته تیلریا حاصل می‌شود با ایجاد عفونت در بدن حیوان گیرنده واکسن آغاز می‌شود بطوریکه با انتقال شیزونت تک یاخته از سلول‌های رده واکسن یا دهنده (donor) به سلول‌های پاک میزبان (recipient) شروع می‌شود. همانطور که اشاره شد ایمنی در تیلریوز بواسطه لمفوسیت‌های T بوده و لازم است آنتی ژن‌های انگلی روی ملکول‌های MHC خودی به سلول‌های سیستم ایمنی عرضه شوند بنابراین انتقال انگل از سلول رده واکسن به سلول میزبان فرآیندی بسیار ضروری در القاء ایمنی می‌باشد.

در پاساژهای طولانی، تنوع ژنتیکی رده‌های سلولی آلوده به شیزونت تیلریا کاهش می‌یابد هر چند بنظر می‌رسد این موضوع اثری در کاهش قدرت ایمنی زائی در برابر چالش با ایزوله‌های هترولوگ نداشته باشد (۱۴). بر این اساس سویه واکسن ایران هر چند با طی بیش از ۲۶۰ پاساژ از تنوع کمتری برخوردار است ولی طبق نتایج حاصل از استفاده آن، ایمنی محافظت کننده خوبی ایجاد کرده است. بنابراین تعداد پاساژهای زیادی که رده سلولی واکسن S15 پشت سر گذاشته تاثیری بر نتایج ایمنی محافظت کننده نداشته و با توجه به مصرف گسترده آن در بیش از ۳۰ استان در مدت نزدیک به چهار دهه، محافظت خوبی در برابر سویه‌های مختلف موجود ایجاد کرده است (۳۱ و ۳۳).

برای عملکرد مناسب واکسن تخفیف حدت یافته تیلریوز لازم است سلول‌های آلوده به شیزونت بطور زنده به حیوان حساس تلقیح شوند و در اختیار سیستم ایمنی حیوان گیرنده قرار گیرد بنابراین ضروری است واکسن پس از تولید در مقیاس انبوه در ترکیبی حاوی مواد محافظت کننده از سرما(Cryoprotective agent) بخصوص ترکیبات گلیسرول و قندی در محیطی ایزوتونیک ذخیره و در سرمای عمیق (-70 ^{oC}) یا ازت مایع (-196 ^{oC}) منجمد و نگهداری می‌شود (۲۳ و ۳۵).

مدت تداوم ایمنی متعاقب واکسیناسیون در منابع منتشره و موجود متغیر بوده ولی آنچه همگی توافق دارند این است که ایمنی حاصله مادام العمر نبوده و مدت تداوم ایمنی در گاوهای واکسینه بین شش ماه تا سه و نیم سال عنوان شده بطوریکه علت این تفاوت شاید به سویه واکسن مورد استفاده و امکان چالش طبیعی با کنه آلوده در صحرا مرتبط باشد که این پدیده منجر به تجدید ایمنی (Boost) بطور طبیعی می‌شود (۷). با تجربه صحرائی گسترده‌ای که حاصل استفاده طولانی مدت و موفق واکسیناسیون در ایران می‌باشد بنظر نمی‌رسد فرضیه فوق اشکالی در روند ایمن سازی مجدد در ایران داشته باشد (۳۱، ۳۳ و ۳۴).

برای کنترل و پیشگری، مهمترین سیاست اجرائی، تولید و مصرف واکسن زنده تخفیف حدت یافته در مناطق آلوده به تیلریوز حاره‌ای می‌باشد. هر چند تاثیر واکسن زنده تخفیف حدت یافته در برابر سویه‌های محلی بخوبی ثابت شده ولی قدرت محافظت کنندگی آن در برابر سویه‌های هترولوگ (Cross protection) که مربوط به مناطق و کشورهای دیگر می‌باشد به اثبات نرسیده است. البته براساس تجربیات موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در طول نزدیک به چهار دهه مصرف گسترده واکسن در استان‌های مختلف ایران (۳۱، ۳۳ و ۳۴) و اخیراً سه سال صادرات واکسن به کشور تاجیکستان، هیچگونه عوارض جدی و نامطلوبی از آن گزارش نشده، ضمن اینکه اشتیاق بالائی از سوی مصرف کنندگان داخلی و خارجی با توجه به اثرات کنترلی و موثر آن در تداوم ایمن سازی و کنترل بیماری با این واکسن وجود دارد. دلیل این موفقیت شاید بعلت تشابهات ملکولی موجود در ساختار آنتی ژنی ایزوله‌ها و سویه‌های مختلف تیلریا آنولاتا باشد بطوریکه بررسی‌های ملکولی و فیلوژنی بعمل آمده با استفاده از ژن rRNA در مورد تعدادی از ایزوله‌ها و سویه‌های واکسن ایران و حتی ایزوله‌های کشور عراق قرابت بسیار بالائی را نشان داده است (۲۷ و ۴۸).

واکسن‌های تحت جزء (Subunit). هر چند استفاده از واکسن زنده تخفیف حدت یافته بر علیه تیلریوز موفقیت آمیز بوده و کارائی مطلوبی در سطح صحرا نشان داده ولی بدلایلی همچون مشکلات اجرائی در مسیر نقل و انتقال واکسن، هزینه بالا و خطر برگشت پذیری واکسن که بطور تئوری همواره در کنار واکسن‌های زنده مطرح است تلاش‌هائی در جهت تولید واکسن‌های جایگزین بر مبنای آنتی ژن‌های اختصاصی تک یاخته در حال اجرا می‌باشد (۴۴ و ۵۱).

واکسن‌های تحت جزء آنتی ژن مروزوایت تیلریا. از آنجائیکه کم خونی از علائم مهم عفونت به تیلریا آنولاتا است برخی توجهات معطوف به امکان ایمن سازی علیه مرحله اریتروسیتی انگل شد. آنتی ژنی در سطح مروزوایت تیلریا یافت شده با وزن ملکولی ۳۲-۳۰ کیلو دالتون که تحت عنوان Tams-1 نامگذاری شده است. استفاده از این آنتی ژن موجب القاء پاسخ هومورال قدرتمندی در حیوانات آلوده شد هر چند در بررسی‌های اپیدمیولوژی روی ایزوله‌های مختلف تفاوت‌های آللی بسیاری برای این آنتی ژن یافت شده است (۲۵ و ۶۳).

واکسن تحت جزء آنتی ژن‌های اسپوروزوایت تیلریا. بررسی‌های انجام

شـده روی دام‌های بهبود یافته از تیلریا نشان می‌دهد که این حیوانات قادر به کنترل عفونت در مرحله اسـپوروزوایت هسـتند. بطوریکه با تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه شـکل اسـپوروزوایت تیلریا می‌توانند باعث خنثی شـدن قدرت عفونت زائی تک یاخته شـده و از شدت بیماری کاسته شود. آنتی ژن سـطحی اسـپوروزوایت در تیلریا پاروا از ۷۰۹ اسـید امینه با وزن ملکولی ۶۷ کیلودالتون بوده که به اختصار p۶۷ نامیده می‌شود (۵۱). آنتی ژن سـطحی اسپوروزوایت در تیلریا آنولاتا بنام SPAG-1 با ۹۰۷ اسیدامینه بـوده و هومولـوژی بالائی با آنتی ژن p۶۷ دارد. هر دو آنتی ژن دارای تنها یک کپی در ژنوم انگل هسـتند. بررسـی‌ها نشان داده که در تیلریا آنولاتا آنتی ژن SPAG-1 شـدیداً پلیمرفیسـم دارد در صورتیکه تنوع چندانی از آنتی ژن p67 گزارش نشده است (۴۴).

آنتـی ژن p67 به اشـکال مختلفـی در سیسـتم‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی تهیه و در بررسی‌های ایمونولوژی مورد آزمایش قرار گرفته است (۸). آنتی ژن نوترکیب اسـپوروزوایت تیلریـا آنولاتا SPAG-1 نیز بعنوان واکسـن نوترکیب مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته است. در یک بررسی کـه این آنتی ژن بهمـراه اجوانت‌های مختلف همراه بـود و نهایتاً آزمایش چالش با اسـپوروزوایت انگل انجام شـد نتایج بدسـت آمـده نشان داد که درجـات مختلفی از محافظـت در تعدادی از دام‌های مـورد مطالعه ایجاد می‌شود بطوریکه واکسن مصرفی موجب تاخیر در بروز علائم و کاهش دوره بیماری می‌گردد (۹).

واکسن‌های سـاب یونیت ملکول‌های ایمونودامینانت پلیمرف در تیلریا پاروا. بررسـی‌های اخیر انجام شـده بر روی حیوانات ایمـن بر علیه تیلریا پاروا که در برابر دوزهای کشنده اسـپوروزوایت مقاومت داشـتند نشان داد که لمفوسیت‌های +T CD8 این دام‌ها به پپتیدهای آنتی ژنی خاصی به نام Tp2 واکنـش نشان داده و تولید اینترفـرون گاما در آزمایش الیزپات نشان می‌دهد که نقش Tp2 در ایمنی محافظت بخش مهم بوده و البته این آنتی ژن هدف سـلول‌های CTL می‌باشـد. بنابراین آنتی ژن Tp2 دارای قابلیت بررسی و استفاده در تولید واکسن موثر بر علیه تیلریا پاروا می‌باشد (۶۵).

واکسـن ضد کنـه. از آنجائیکه کنـه میزبان بی مهـره و ناقل تیلریوز می‌باشـد می‌توان با حـذف یا کاهش جمعیـت کنه به مبـارزه با بیماری پرداخت. بنابراین با هدف قرار دادن کنه از طریق آنتی بادی‌های اختصاصی که بر علیه آنتی ژن‌های روده‌ای کنه تولید می‌شود، کمپلکس آنتی ژن آنتی بادی در روده کنه تشکیل شـده و نهایتاً مرگ کنه را بدنبال خواهد داشت. بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه روی کنه *Boophilus microplus* بـوده که از مهمترین کنه‌های ناقل عوامل بیماریزا در حیوانات منجمله گاو می‌باشـد. آنتی ژن روده‌ای این کنه بنام Bm86 شناسـائی و محصول آن بشکل فرآورده نوترکیب تهیه شده است. این واکسن به شکل تجاری تولید و در استرالیا، کوبا، مکزیک و چند کشور دیگر امریکای لاتین تولید و مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت. گفته شـده مصرف این واکسن موجب کاهش میزان آلودگی کنه و میزان مصرف سـموم ضد کنه شده، همچنین افزایش تولید دام و کاهش بیماری‌های منتقله بوسـیله کنه را بهمراه داشـته است (۱۵ و ۴۲).

نتیجه گیری نهائی

تک یاخته تیلریا آنولاتا انگل داخل سلولی گاو بوده که در مراحلی از چرخه زندگی بطور خارج سلولی و آزاد دیده می‌شود تمامی‌این مراحل قادر به تحریک سیسـتم ایمنی بوده و پاسخ‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند که برخی محافظت بخش بوده و بعضی صرفاً بعلت تماس با آنتی ژن‌های انگلی بوجـود آمده و نقـش محافظت کنندگی چندانی ندارنـد. ایمنی هومورال در مواجهه با آنتی ژن‌های آزاد و خارج سـلولی تیلریا مانند اسـپوروزوایت و مروزوایت تحریک و موجب تولید آنتی بادی‌های اختصاصی می‌شـود که بررسی‌های انجام شده نقش مهمی‌برای این آنتی بادی‌ها قائل نبوده بطوریکه در بررسی‌های اخیر پاسخ محافظت کنندگی بمیزان ۵۰ درصد گزارش شده اسـت. در حالیکه ایمنی سـلولی بر علیه اشکال داخل سلولی تیلریا بوجود آمده و از طریق گروهی از سـلول‌ها و مشتقـات آنها واکنش نشان داده که منجر به پاسخ قوی سیتوتوکسیک شده و در برابر چالش با تک یاخته حاد محافظت بخش می‌باشد. براین اساس ایمونوژن‌های مختلفی مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته‌اند که مهمترین آنها آنتی ژن‌های مروزوایت Tams-1، اسپوروزوایت SPAG-1 و اپی توپ‌های هدف لمفوسیت‌های سیتوتوکسیک Tp1 می‌باشـند ولی بمنظور مقابله با تیلریوز حاره‌ای تنها واکسـن موثر و مورد تائید OIE واکسـن زنده کشت سلولی شـیزونت تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا می‌باشـد که در چندین کشـور منجمله ایران تولید، مصرف و نتایج موفقیت آمیزی بهمراه داشته است.

منابع مورد استفاده

1. Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. (2004). Basic immunology: functions and disorders of the immune system, 2nd edn. London: Elsevier Health Sciences.

2. Ahmed JS, Shayan P, Hugel FU, Biermann R, Ewald C, Schein E, Gerdes J. (1997). Macroschizonts of *Theileria annulata* as vaccine and diagnostic tools. Tropical Animal Health and Production. Vol, 29, 4 Suppl. pp: 128S-132S.

3. Ahmed, J.S. and Mehlhorn, H. (1999). Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. Parasitology Research. Vol, 85, No, 7. pp: 539-49.

4. Ahmed, J.S., Diesing, L., Oechtering, H., Ouhelli, H. and Schein, E. (1988). The role of antibodies in immunity against Theileria annulata infection in cattle. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.Vol, 267, No, 3. pp: 425-31.

5. Ahmed, J.S., Glass, E.J., Salih, D.A. and Seitzer, U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. Innate Immunity. Vol, 14, No, 1. pp: 5-12.

6. Ahmed, J.S., Hartwig, H., Rothert, M., Steuber, S. and Schein, E. (1989). Cytotoxicity and production of interleukin-2 and gamma interferon by peripheral blood lymphocytes of *T. annulata* infected cattle. Immunobiology. Vol, 14, Suppl. P: 175.

7. Beniwal, R.K., Sharma, R.D. and Nichani, A.K. (2000) Determination of duration of immunity of calves vaccinated with the *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine. Veterinary Parasitology. Vol, 90, No, 1-2. pp: 25-35.

8. Bishop, R., Nene, V., Staeyert, J., Rowlands, J., Nyanjui, J.,

Osaso, J., Morzaria, S. and Musoke, A. (2003). Immunity to East Coast fever in cattle induced by a polypeptide fragment of the major surface coat protein of *Theileria parva* sporozoites. Vaccine. Vol, 21, No, 11-12. pp: 1205-12.

9. Boulter, N., Knight, P.A., Hunt, P.D., Hennessey, E.S., Katzer, F., Tait, A. et al. (1994). *Theileria annulata* sporozoite surface antigen (SPAG-1) contains neutralizing determinants in the C terminus. Parasite Immunology. Vol, 16, No, 2. pp: 97-104.

10. Brown, C.G., Stagg, D.A., Purnell, R.E., Kanhai, G.K. and Payne, R.C. (1973). Letter: Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of *Theileria parva*. Nature. Vol, 245, No, 5420. pp: 101-3.

11. Brown, W.C., Shaw, M.K., Conrad, P.A. and Dolan, T.T. (1989). *Theileria parva*: reappearance of schizonts in infected lymphoblastoid cells treated with parvaquone is dependent on interleukin 2-like growth factors. Experimental Parasitology. Vol, 68, No, 3. pp: 308-25.

12. Chaudhri, S.S. and Subramanian, G. (1992). Cell-mediated immune responses to sporozoites and macroschizonts of *Theileria annulata*. Veterinary Parasitology. Vol, 41, No, 1-2. pp: 23-34.

13. Cunningham, M.P., Brown, C.G., Burridge, M.J. and Purnell, R.E. (1973). Cryopreservation of infective particles of *Theileria parva*. International Journal for Parasitology. Vol, 3, No, 5. pp: 583-7.

14. Darghouth, M.A., Ben Miled, L., Bouattour, A., Melrose, T.R., Brown, C.G., Kilani, M. (1996). A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. Parasitology Research. Vol, 82, No, 7. pp: 647-55.

15. de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M. and Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Animal Health Research Reviews. Vol, 8, No, 1. pp: 23-8.

16. Dobbelaere, D.A., Fernandez, P.C. and Heussler, V.T. (2000). *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. Cell Microbiol. Vol, 2, No, 2. pp: 91-9.

17. d'Oliveira, C., van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquiet, P. and Jongejan, F. J. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. Clinical Microbiology. Vol, 33, No, 10. pp: 2665-9.

18. Emery, D.L. (1981). Adoptive transfer of immunity to infection with *Theileria parva* (East Coast fever) between cattle twins. Research in Veterinary Science. Vol, 30, No, 3. pp: 364-7.

19. Fawcett, D.W., Doxsey, S., Stagg, D.A. and Young, A.S. (1982). The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations. European Journal of Cell Biology. Vol, 27, No, 1. pp: 10-21.

20. Forsyth, L.M., Jackson, L.A., Wilkie, G., Sanderson, A., Brown, C.G. and Preston, P.M. (1997). Bovine cells infected in vivo with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor. Veterinary Research Communications. Vol, 21, No, 4. pp: 249-63.

21. Geysen, D., Bishop, R., Skilton, R., Dolan, T.T. and Morzaria, S. (1999). Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Tropical Medic*ine and *International* Health. Vol, 4, No, 9. pp: A21-7.

22. Habibi, G., Bozorgi, S., Esmaeil-Nia, K., Najjar, E. and Mohammadipour, A.R. (2008). Detection and Discrimination of Theileria annulata and Theileria lestoquardi by using a Single PCR. Archives of Razi Institute, Vol, 63, No, 1. pp: 47-52.

23. Habibi, G., Bozorgi, S., Hatami, A., Esmaei-Nia, K. and Afshari, A. (2012). Study on Cryo-preservation of *Theileria annulata* Schizont Infected Cell Line Vaccine Strain S15. Archives of Razi Institute. Vol, 67, No, 2. pp: 167-172.

24. Habibi, G.R., Esmaeil Nia, K., Bozorgi, S., Hashemi-Fesharki, R. and Bordbar, N. (2009). Semi-quantitative Analysis of Expression of Various Genes in relation to Possible Markers for *Theileria annulata* Attenuation. Archives of Razi Institute, Vol, 64, No, 1.pp: 9-17

25. Habibi, G.R., Esmaeil-Nia, K., Bozorgi, S., Najjar E., Hashemi-Fesharki, R. and Bordbar, N. (2007). PCR-based Detection of Theileria infection and molecular characterization of Tams1 *T. annulata* vaccine strain. Archives of Razi Institute. Vol, 62, No, 2. pp: 83-89.

26. Habibi, G.R., Khamesipour, A., McMaster, W.R. and Mahboudi, F., (2001). Cytokine Gene Expression in healing and Non-healing cases of cutaneous Leishmaniasis in response to in vitro stimulation with recombinant gp63 using sqRT-PCR Scandinavian journal of Immunology. Vol, 54, No, 4. pp: 414-20.

27. Habibi, G. (2012). Phylogenetic Analysis of *Theileria annulata* Infected Cell Line S15 Iran Vaccine Strain. Iranian Journal of Parasitology. Vol, 6, No, 2. pp: 73-81

28. Habibi, GR.; Esmaeil-Nia, K.; Izadi, H.; Afshari, A. and Bozorgi, S. (2012). Evaluation of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-a) Gene Expression in Immunized Cattle with Two Types of Bovine Theileriosis Vaccine Preparation. The 11th International Congress of Immunology and Allergy of Iran. Milad Tower, Tehran, Iran 26-29 April.

29. Haghparast, A., Heidari Kharaji, M., Malvandi, A.M. and Habibi, Gh.R. Differential Expression of Pattern Recognition Receptors(PRRs)in *Theileria annulata* Schizont Infected Cell Lines. Proceedings of the 9th international veterinary immunology symposium; 2010 August 16. Tehran, Iran. 2010.

30. Hall, R., Ilhan, T., Kirvar, E., Wilkie, G., Preston, P.M., Darghouth, M. et al. (1999). Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. Tropical Medicine and International Health. Vol, 4, No, 9. pp: A78-84.

31. Hashemi-Fesharki, R. (1998). Recent development in control of *Theileria annulata* in Iran. Parasite. Vol, 5, No, 2. pp: 193-6.

32. Hashemi-Fesharki R. (1991) Chemotherapeutic value of parvaquone and buparvaquone against *Theileria annulata* infection of cattle. Research in Veterinary Sciences. Vol, 50. pp: 204–207.

33. Hashemi-Fesharki, R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. Parasitology Today. Vol, 4, No, 2. pp: 36-40.

34. Hashemi-Fesharki R. and Shad-Del F. (1973a). Vaccination of calves and milking cows with different strains of *Theileria annulata*. American Journal of Veterinary Research. Vol, 34, No, 11. pp: 1465-7.

35. Hashemi-Fesharki, R. and Shad-Del, F. (1973b). Long term maintenance of *Theileria annulata* strains by freezing at -70 degrees C. The Veterinary Record. Vol, 92, No, 6. pp: 150-1.

36. Hashemi-Fesharki, R., Golchinfar, F., Madani, R. and Esmaeilnia, K. (2006). Comparative evaluation of antibody positive titer by ELISA and IFA in *Theileria annulata* vaccinated cattle in Iran. Parasite. Vol, 13, No, 1. pp: 71-4.

37. Hashemi-Fesharki, R., Habibi, G.R. and Ahourai, P. (1998). Delayed type hypersensitivity theilerin test in cattle vaccinated against *Theileria annulata* infection. Veterinary Parasitology. Vol, 75, No, 2-3. pp: 261-3.

38. Hooshmand-Rad, P. and Hashemi-Fesharki, R. (1971). Complement-fixing antibodies in cattle experimentally infected with *Theileria annulata* or vaccinated with tissue cultures. The British Veterinary Journal. Vol, 127, No, 5. pp: 244-50.

39. Huang, D.S., Wang, Y., Marchalonis, J.J. and Watson, R.R. (1993). The kinetics of cytokine secretion and proliferation by mesenteric lymph node cells during the progression to murine AIDS, caused by LP-BM5 murine leukemia virus infection. Regional Immunology. Vol, 5, No, 6. pp: 325-31.

40. Irvin, A.D. (1987). Characterization of species and strains of Theileria. Advanced Parasitology. Vol, 26. pp: 145-97.

41. Jensen, K., Paxton, E., Waddington, D., Talbot, R., Darghouth, M.A. and Glass, E.J. (2008) Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. International Journal of Parasitology. Vol. 38 No. 3-4 pp:313-25.

42. Jeyabal, L., Kumar, B., Ray, D., Azahahianambi, P. and Ghosh, S. (2012). Vaccine potential of recombinant antigens of *Theileria annulata* and *Hyalomma anatolicum* anatolicum against vector and parasite.Veterinary Parasitology. Vol, 188, No, 3-4. pp: 231-8.

43. Kachani, M., Spooner, R.L., Rae, P., Bell-Sakyi, L. and Brown, C.G. (1992). Stage-specific responses following infection with *Theileria annulata* as evaluated using ELISA. Parasitology Research. Vol, 78, No, 1. pp: 43-7.

44. Katzer, F., Carrington, M., Knight, P., Williamson, S., Tait, A., Morrison, I.W. and Hall, R. (1994). Polymorphism of SPAG-1, a candidate antigen for inclusion in a sub-unit vaccine against *Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol, 67, No, 1. pp: 1-10.

45. McHardy, N. and Morgan, D.W. (1985). Treatment of *Theileria annulata* infection in calves with parvaquone. Research in Veterinary Science. Vol, 39, No, 1. pp: 1-4.

46. McKeever, D.J. (2009). Bovine immunity - a driver for diversity in Theileria parasites? Trends in Parasitology. Vol, 25, No, 6. pp: 269-76.

47. McKeever, D.J., Nyanjui, J.K. and Ballingall, K.T. (1997). In vitro infection with *Theileria parva* is associated with IL10 expression in all bovine lymphocyte lineages. Parasite Immunology. Vol, 19, No, 7. pp: 319-24.

48. Mohammad Al-Saeed, A.T., Omer, L.T., Abdo, J., Habibi, G., Salih, D.A., Seitzer, U. and Ahmed, J. (2009). Epidemiological studies on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Kurdistan Region, Iraq. Parasitology Research. Vol, 106, pp: 403-407.

49. Morrison, W.I. and McKeever, D.J. (2006). Current status of vaccine development against Theileria parasites. Parasitology. Vol, 133, Suppl: S169-87.

50. Muhammed, S.I., Lauerman, L.H. Jr. and Johnson, L.W. (1975). Effect of humoral antibodies on the course of Theileria parva infection (East Coast fever) of cattle. American Journal of Veterinary Research. Vol, 36, No, 4. Pt.1 pp: 399-402.

51. Nene, V., Iams, K.P., Gobright, E. and Musoke, A.J. (1992). Characterisation of the gene encoding a candidate vaccine antigen of *Theileria parva* sporozoites. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol, 51, No, 1. pp: 17-27.

52. OIE (World Organization for Animal Health), Theileriosis (2008). http:/ /www.oie.int/ fileadmin/ Home/ eng/ Health_standards/ tahm/ 2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf.

53. Pipano, E. and Tsur, I. (1966). Experimental immunization against Theileriosis due to Theileria annulata with a tissue culture vaccine. Refuah Veterinarith. Vol, 23. pp: 188-194.

54. Preston, P.M. and Brown, C.G. (1988). Macrophage-mediated cytostasis and lymphocyte cytotoxicity in cattle immunized with *Theileria annulata* sporozoites or macroschizont-infected cell lines. Parasite Immunology. Vol, 10, No, 6. pp: 631-47.

55. Preston, P.M., Brown, C.G. and Spooner, R.L. (1983). Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. Clinical and Experimental Immunology. Vol, 53. pp: 88–100.
56. Preston, P.M., Brown, C.G., Entrican, G., Richardson, W. and Boid, R. (1993). Synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interferons by mononuclear cells from *Theileria annulata*-infected cattle. Parasite Immunology. Vol, 15, No, 9. pp: 525-34.
57. Preston, P.M., Hall, F.R., Glass, E.J., Campbell, J.D., Darghouth, M.A., Ahmed, J.S. et al. (1999). Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. Parasitology Today. Vol, 15, No, 7. pp: 268-74.
58. Rose, R.M., Fuglestad, J.M. and Remington, L. (1991). Growth inhibition of *Mycobacterium avium* complex in human alveolar macrophages by the combination of recombinant macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Vol, 4, No, 3. pp: 248-54.
59. Schnittger, L., Katzer, F., Biermann, R., Shayan, P., Boguslawski, K., McKellar, S. et al. (2002). Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol, 120, No, 2. pp: 247-56.
60. Sergent E., Donatien A., Parrot L. and Lestoquard F. (1935). Theilerioses bovines de l'Afrique du Nord et du Proche-Orient. Archives de l'Institut Pasteur d'Algerie Vol. 13. P: 472.
61. Shayan P., and Sadegh Rahbari (2005). Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. on stained blood smear using PCR. Parasitology Research.Vol, 97. pp: 281-286.
62. Shayan P., and Sadegh Rahbari (2007). Differentiation of Theileria spp. and Babesia spp. by polymerase chain reaction. Journal of veterinary Research. Vol, 62, No, 2. pp: 15-20.
63. Shiels, B.R., d'Oliveira, C., McKellar, S., Ben-Miled, L., Kawazu, S. and Hide, G. (1995). Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of Theileria parasites. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol, 72, No, 1-2 pp: 149-62.
64. Spooner, R.L., Innes, E.A., Glass, E.J. and Brown, C.G. (1989). *Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. Immunology. Vol, 66, No, 2. pp: 284-8.
65. Steinaa, L., Saya, R., Awino, E. and Toye, P. (2012). Cytotoxic T lymphocytes from cattle immunized against *Theileria parva* exhibit pronounced cross-reactivity among different strain-specific epitopes of the Tp1 antigen.Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol, 145, No, 3-4. pp: 571-81.
66. Swan, D.G., Phillips, K., Tait, A. and Shiels, B.R. (1999). Evidence for localisation of a Theileria parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol, 101, No, 1-2. pp: 117-29.
67. Swan, D.G., Stern, R., McKellar, S., Phillips, K., Oura, C.A., Karagenc, T.I. et al. (2001). Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. Journal of Cell Science. Vol, 114, Pt 15. pp: 2747-54.
68. Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D. and Remington, J.S. (1998). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science. Vol, 240, No, 4851. pp: 516-8.
69. Tait, A. and Hall, F.R. (1990). *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. Revue Scientifique et Technique. Vol, 9, No, 2. pp: 387-403.
70. Taracha, E.L., Awino, E. and McKeever, D.J. (1997). Distinct CD4+ T cell helper requirements in Theileria parva-immune and -naive bovine CTL precursors. Journal of Immunology. Vol, 159, No, 9. pp: 4539-45.
71. Tsur, I. and Adler, S. (1965). The cultivation of lymphoid cells and *Theileria annulata* schizonts from infected bovine blood. Refuah Veterinarith. Vol, 22. P: 62.
72. Uilenberg G, Hashemi-Fesharki R. (1984). *Theileria orientalis* in Iran. Vet Q. Vol, 6. No, 1. pp: 1-4.
73. Visser, A.E., Abraham, A., Sakyi, L.J., Brown, C.G. and Preston, P.M. (1995). Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever. Parasite Immunology. Vol, 17. pp: 91–102.