تشخیص آلودگی گاومیش‌های بومی به *تیلریا اورینتالیس* در استان آذربایجان‌غربی با استفاده از روش‌های مولکولی و میکروسکوپی

بابک نریمانی[1*]، ناصر حقوقی راد[2]، پرویز شایان[3]، صادق رهبری[2]، کسری اسمعیل‌نیا[4]

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

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

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

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

*نویسنده مسئول مکاتبات: narimani.b@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹٦/۷/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۱/۱۹)

چکیده

عامل ایجادکننده بیماری تیلریوز در گاوها، انگل تک‌یاخته‌ای خونی داخل سلولی اجباری به نام *تیلریا آنولاتا* بوده که باعث کم‌خونی شدید، خیز شدید ریه‌ها و به‌خصوص در دام‌های غیربومی موجب مرگ سریع می‌شود. هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاومیش‌های بومی و ارتباط آن با عوامل محیطی در چهار شهر استان آذربایجان‌غربی با روش‌های میکروسکوپی و مولکولی بود. به‌طور تصادفی ۲۹۱ نمونه خون از گاومیش‌های منطقه از اسفند ۱۳۹۲ تا تیر ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. روش‌های PCR مستقیم و semi-nested PCR نیز برای ارزیابی DNA گونه‌های انگل تیلریا با استفاده از جفت‌پرایمرهای ویژه جزء rRNA-18S مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی میکروسکوپی، حضور این انگل در ٤ رأس گاومیش (۱/۳۷ درصد از گاومیش‌های مورد آزمایش) تأیید گردید. بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که نمونه‌های خون در ٤ مورد از ۲۹۱ رأس گاومیش (۱/۳۷ درصد از موارد) به انگل *تیلریا آنولاتا* (*Theileria annulata*) آلوده بودند. همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس گاومیش ماده بالغ (۰/٦۸ درصد از گاومیش‌های مورد آزمایش) به‌طور هم‌زمان به گونه *تیلریا اورینتالیس* (*Theileria orientalis*) هم آلوده بوده‌اند. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی گاومیش به *تیلریا آنولاتا* در روش مولکولی به‌ترتیب ۱/۳۷ و ۱ درصد به‌دست آمد. شانس آلودگی به گونه‌های *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* برابر بود. شیوع مولکولی *تیلریا آنولاتا* در شهرهای ارومیه و سلماس به‌ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (p<۰/۰۵). شیوع مولکولی *تیلریا اورینتالیس* در شهر ارومیه ۲/۲ درصد برآورد شد. این مطالعه برای اولین بار تایید کرد که انگل *تیلریا اورینتالیس* در گاومیش‌های بومی شهر ارومیه ایران وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: *تیلریا اورینتالیس*، گاومیش، آزمایش میکروسکوپی، تشخیص مولکولی، آذربایجان‌غربی.

مقدمه

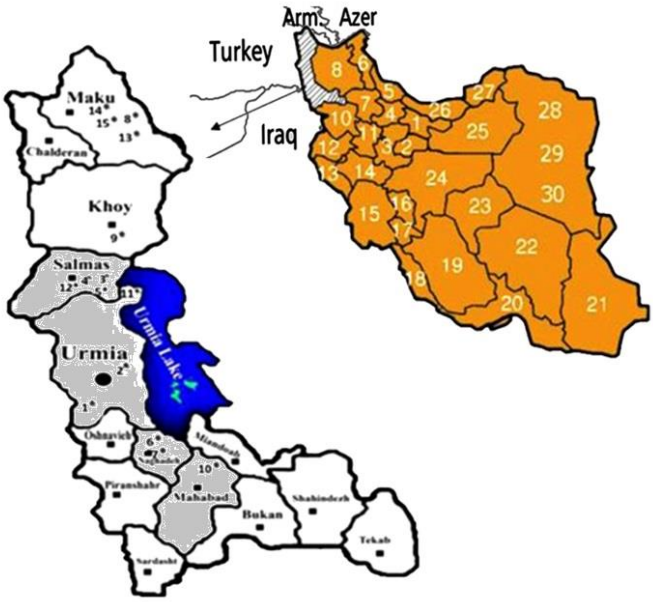
هفت گونه از انگل جنس تیلریا می‌توانند خانواده گاوان را آلوده کنند که از بین آنها *تیلریا پاروا*، *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا ولیفرا* در گاومیش معمولاً ایجاد علایم بیماری می‌کنند. البته بیماری ایجادشده توسط *تیلریا اورینتالیس* از لحاظ درمانگاهی اغلب ملایم و یا کم علامت می‌باشد (Hoseini *et al*., 2003) (جدول ۱).

شکل اسپوروزوایت انگل تیلریا، عقده لنفاوی مجاور محل خونخواری را آلوده می‌کند و در سیتوپلاسم سلول‌های لنفاوی مستقر می‌گردد. اسپوروزوییت‌ها با تکثیر به روش شیزوگونی، شیزونت-هایی (موسوم به اجسام آبی کخ) ایجاد می‌کنند. این شیزونت‌ها تبدیل به مروزوییت‌های چندهسته‌ای شده و مروگونی باعث پارگی لنفوسیت و رهایی مروزوییت‌ها از آن و نفوذ به گلبول‌های قرمز می‌شود. سپس مروزوییت‌های آزاد در سیتوپلاسم تبدیل به پیروپلاسم می‌گردند. از طرف دیگر سلول‌هایی در گردش خون محیطی و طحال نیز وجود دارند که می‌توانند تکثیر انگل را در داخل لنفوسیت، محدود کنند و یا حتی سلول‌های هدف را از بین ببرند (Ahmad and Melhorn, 1999; Bishop *et al*., 2004; Shaw, 2002; Striepen *et al*., 2007). باید توجه گردد که روش تشخیص انتخابی انگل مذکور فقط در مرحله ابتدای بیماری، تهیه گسترش از عقده لنفاوی و مشاهده آن به وسیله میکروسکوپ نوری می‌باشد. اما گزارش شده که استفاده از روش PCR در نمونه خون، می‌تواند آلودگی را در مرحله مزمن نیز مشخص کند، حتی اگر همان دام‌ها با استفاده از روش PCR بر روی نمونه‌های عقده-های لنفاوی، از نظر آلودگی مذکور، منفی تشخیص داده شوند (Ahmad and Melhorn, 1999).

جدول ۱- گونه‌های انگل تیلریا که در گاومیش ایجاد آلودگی می‌کنند

گونه	پراکندگی	بیماری زایی	ناقل بندپای احتمالی در ایران	میزبان
تیلریا آنولاتا (دیسپار)	شمال آفریقا، جنوب اروپا، خاورمیانه، هند و جنوب شوروی سابق	تیلریوز گرمسیری، تب ساحل مدیترانه‌ای، تب مصری	*هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* *هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم* *هیالوما مارژیناتوم مارژیناتوم* *هیالوما مارژیناتوم تورانیکوم* *هیالوما دتریتوم*	گاومیش
تیلریا پاروا (لارنسی) (بُویس)	شمال شرق و مرکز آفریقا	تب ساحل شرقی آفریقا، کوریدور گاو، ژانویه زیمبابوه، تب‌کنه‌ای رودزیایی	*ریپی سفالوس آپندیکولاتوس* *ریپی سفالوس زمبزینسیس*	گاومیش
تیلریا ولیفرا	صحرای جنوب آفریقا و جزایر کاراییب	تیلریوز به ظاهر خوش‌خیم	*آمبلیوما واریگاتوم*	گاومیش
تیلریا اورینتالیس	استرالیا، آفریقا، ایالات متحده، آسیا و اروپا	تیلریوز	*همافیزالیس پونکتاتا* *همافیزالیس سینابارینا* *همافیزالیس ژاپنیکوم* *همافیزالیس کومسینا* *همافیزالیس هومروسال*	گاومیش

استان آذربایجان‌غربی از نظر شرایط جوی دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های معتدل می‌باشد و تحت تأثیر اقلیم نیمه‌مدیترانه‌ای است. طول مرز این استان با کشورهای ترکیه ٤٨٨ کیلومتر، عراق ۲۰۰ کیلومتر، نخجوان و ارمنستان ۱۳۵ کیلومتر است. فاصله شهر ارومیه تا مرز سرو (مرز ترکیه) هم حدود ۵۵ کیلومتر می‌باشد (شکل ۱).



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

در سال ۱۳۹٤ در ارومیه مطالعه‌ای روی ۱۳۸ رأس گاومیش از نظر آلودگی به تیلریا صورت گرفت (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016) که نتایج آزمایشات میکروسکوپی و مولکولی ایشان نشان داد که دام‌های مذکور از نظر آلودگی به انگل گونه *تیلریا آنولاتا* مثبت ولی از نظر آلودگی به گونه *تیلریا اورینتالیس* منفی بودند. بررسی‌ها نشان داد که به‌غیر از این تحقیق، مطالعه دیگری در ایران بر وجود آلودگی به انگل تیلریا در گاومیش‌ها صورت نگرفته است. لذا هدف این مطالعه، تعیین آلودگی گاومیش‌های بومی به گونه‌های انگل مذکور در چهار شهر بزرگ استان آذربایجان‌غربی (مهاباد، نقده، ارومیه و سلماس) با روش‌های میکروسکوپی (بررسی گسترش خونی) و مولکولی (استفاده از روشPCR) بود.

مواد و روش‌ها

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

آزمایش در استان آذربایجان‌غربی با درجه اطمینان ۹۵ درصد و خطای مطلق ۵ درصد، در خصوص مجموع تقریبی ٤٠ هزار رأس گاومیش بومی موجود در منطقه، محاسبات لازم صورت گرفت (Thrusfield, 2005) و با همکاری شبکه های دامپزشکی و با استفاده از یک پرسش نامه از اسفند ماه سال ۱۳۹۲ تا تیرماه سال ۱۳۹۳ از تعداد ۲۹۱ رأس گاومیش شامل: ۱۹٤ رأس (٦٧ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نر و ۹۷ رأس (۳۳ درصد از دام‌های مورد آزمایش) ماده، از ٤ شهر استان شامل مهاباد، نقده، ارومیه و سلماس نمونه‌برداری شد. از این تعداد، ۲۱۰ رأس (۷۲ درصد از دام‌های مورد آزمایش) بالغ و ۸۱ رأس (۲۸ درصد از دام‌های مورد آزمایش) نابالغ با ظاهر سالم و دارای سن ٦ ماه تا ۱۰ سال، ۷۳ رأس از مهاباد، ۷۳ رأس از نقده، ۷۲ رأس از ارومیه و ۷۳ رأس از سلماس به صورت تصادفی انتخاب شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد نیاز برای انجام مطالعه حاضر، از گاومیش‌هایی اخذ شدند که منحصراً در همان استان تولد یافته و نگه‌داری می‌گردیدند.

برای انجام آزمایشات، از هر رأس دام، پنج میلی‌لیتر نمونه خون وریدی محیطی، پس از ضدعفونی کردن محل، اخذ گردیده و بلافاصله دو گسترش نازک با استفاده از لام‌های شیشه‌ای از هر نمونه خون تهیه می‌شد. سپس با ریختن متانول خالص (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ, USA) روی گسترش‌های خشک‌شده و گذشت پنج دقیقه، گسترش‌ها تثبیت می‌گردید. همزمان و سریعاً باقی‌مانده هر نمونه در لوله شیشه‌ای ونوجکت (venoject) تمیز ریخته شده و هم حجم آن اتانول (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA) ۷۰ درصد به آن افزوده می‌شد تا نمونه‌های خون کاملاً لخته شوند (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

- **مطالعه میکروسکوپی**: گسترش‌های خونی بعد از تثبیت با متانول به مدت ٤٥ دقیقه با محلول گیمسای ۵ درصد در بافر فسفات سالین پوشانده شدند (Arjmand-Yamchi and Tavassoli, 2016). مشاهده شکل پیروپلاسمی (piroplasm) انگل تیلریا در داخل گلبول‌های قرمز موجود در گسترش‌های تهیه‌شده، به عنوان مثبت بودن آلودگی و عدم مشاهده آن‌ها در ۱۰۰ «میدان دید» میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی بالا (×۱۰۰۰) در هر گسترش به عنوان منفی بودن آلودگی، تلقی می‌گردید (Aktas *et al*., 2006). از آنجا که تفکیک گونه‌ها با میکروسکوپ معمولی، تشخیصی قطعی نمی‌باشد، به همین دلیل از روش مولکولی نیز استفاده گردید (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

- **مطالعه مولکولی**: استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از مجموعه ابزار و مواد کیت استخراج ساخت مؤسسه (PCR Purification Kit, MBST; Iran) طبق دستور عمل شرکت سازنده انجام گرفت. این روش بر اساس اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیسی حامل تعبیه‌شده در ستون پلاستیکی spin ساخت مؤسسه مذکور عمل می‌کند. به طور خلاصه، ابتدا مقدار بسیار کمی از لخته خون کامل با قاشقک تمیز برداشته شده و در داخل دیواره یک میکروتیوب اپندورف (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) تمیز۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده می‌شد. این لوله‌های اپندورف به مدت یک شب در دمای اتاق (با در باز) به دور از هر آلودگی نگه داشته می‌شدند تا کاملاً خشک و بدون چسبندگی و البته

عاری از الکل گردند. در روز بعد، نمونه‌ها در حضور آنزیم پروتئیناز K در دمای ۵۵ درجه سلسیوس با افزودن ۱۸۰ میکرولیتر بافر لایزیس (lysis buffer)، به محلولی کاملاً یکنواخت تبدیل می‌شدند. سپس با افزودن ۳۶۰ میکرولیتر بافر بایندینگ (binding buffer) به هر نمونه، به مدت ۱۰ دقیقه در معرض حرارت مرطوب ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده می‌شدند. در ادامه ۲۷۰ میکرولیتر اتانول مطلق (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA) به لوله حاوی نمونه افزوده و محلول حاصله به ستون spin منتقل می‌شد. محتوای ستون، دو بار با بافر شستشو در سانتریفیوژی (Eppendorf AG, Hamburg; Germany) با ۸۰۰۰ دور در دقیقه تصفیه می‌گردید. سپس با استفاده از بافر الوسیون (elution buffer) DNA استخراج‌شده از هر نمونه به‌طور جداگانه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به حالت منجمد نگه‌داری می‌شد. در نهایت DNA استخراجی از هر نمونه روی ژل آگارز (MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ; USA) ۱/۵ درصد، الکتروفورز (PCR Purification Kit, MBST; Iran) گردیده و کیفیت آن مورد بررسی قرار می‌گرفت (Shayan and Rahbari, 2005).

- انجام PCR و Nested-PCR:

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

در ابتدا جهت ارزیابی و اطمینان از قابلیت عملی DNA، هر یک از نمونه ها با پرایمرهای اختصاصی P1و P2 مشتق‌شده از ژن کدکننده پروتئین بتااکتین (CinnaGen, Tehran; Iran) مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۲- نام و مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده

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

ارزیابی DNA استخراج‌شده از خون گاو با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو Master mix، ۲- محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای Bba-S (P1)(20µM) ,Bba-A (P2) (20µM) (CinnaGen, Tehran; Iran)، ٤- آب دو بار تقطیر شده استریل.

روش آزمایش: بر روی کیسه یخ، در داخل هر میکروتیوب میزان ۱۲/۵میکرولیتر Master mix و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر Bba-S(P1)(20µM) و Bba-A (P2)(20µM)و آب به اندازه نه میکرولیتر و ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو ریخته شد تا حجم نهایی محتوای میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر باشد و بلافاصله در دستگاه ترموسایکلر (Termal Cycler, Bio Rad; USA) با برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام می‌گرفت. نکته مهم این است که در قسمت اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو یا (annealing) در هر مرحله از طول کار، می‌توان درجه حرارت را ۳-۲ درجه سانتی گراد بیشتر تنظیم کرد تا محصول نهایی دستگاه کیفیت بالاتری داشته باشد (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

برنامه دستگاه ترموسایکلر:

مرحله ۱: به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس: واسرشت (denaturation)

مرحله ۲:

دو سری:

٤٥ ثانیه در ٩٤ درجه سلسیوس: واسرشت

٩٠ ثانیه در ٦٥ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو (annealing)

٤٥ ثانیه در ٧٢ درجه سلسیوس: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت (extention)

دو سری:

٤٥ ثانیه در ٩٤ درجه سلسیوس: واسرشت

٦٠ ثانیه در ٦٥ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو

٤٥ ثانیه در ٧٢ درجه سلسیوس: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت

سی و چهار سری:

٤٥ ثانیه در ٩٤ درجه سلسیوس: واسرشت

٤٥ ثانیه در ٦٥ درجه سلسیوس: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو

٤٥ ثانیه در ٧٢ درجه سلسیوس: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت

مرحله ۳: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس: زمان ساخت تکمیلی

بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

اندازه محصول PCR در این مرحله ٦٣٩ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

تشخیص تک یاخته در خون با استفاده از روش PCR:

به علت تنوع خاص گونه‌ای موجود در ژن حفاظتی (18SrRNA) از آن به‌عنوان یک شاخص در تشخیص دقیق گونه انگل‌ها، طبقه‌بندی تاکسونومیک و تحقیقات فیلوژنیک بهره‌برداری می‌شود (Salim *et al*., 2010).

مواد مورد نیاز: ۱- DNA الگو، ۲- Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)، ۳- پرایمرهای Tbs-A (20µM) ,Tbs-S (20µM)(CinnaGen, Tehran; Iran)، ٤- آب دو بار تقطیرشده استریل.

اندازه محصول PCR نمونه‌های خونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4)

منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA آزموده شده و در خانواده بابزی ایده بین ۴۰۰-۳۹۰ جفت باز می باشد، در صورتی که در خانواده تیلری ایده ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز است (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

- **Nested-PCR**

– حساسیت این روش بسیار بالاتر از روش PCR معمولی است.

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

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

– **انجام** Semi-nested PCR :

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

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

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

بررسی حضور *تیلریا آنولاتا* با استفاده از روش مولکولی:

مواد مورد نیاز:

۱) فقط آن محصول PCR که مثبت شده

۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)

۳) پرایمرهای Ta-S (P5)(20µM) و Tbs-A (P4)(20µM) (CinnaGen, Tehran; Iran)

۴) آب دو بار تقطیر شده استریل

روش آزمایش:

بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی Ta-S (P5) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند.

اندازه محصول در این مرحله برای *تیلریا آنولاتا* ۱۹۳ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

بررسی حضور *تیلریا اورینتالیس* با استفاده ازروش مولکولی:

مواد مورد نیاز:

۱) فقط آن محصول PCR که در دو مرحله قبل مثبت شده است.

۲) Master mix محلول (CinnaGen, Tehran; Iran)

۳) پرایمرهای To-S (P6)(20µM) و Tbs-A (P4)(20µM) (CinnaGen, Tehran; Iran)

٤) آب دو بار تقطیر شده استریل

روش آزمایش:

بدین منظور فقط باید محصول نمونه‌هایی که نتیجه PCR آن‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S (P3) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن کدکننده 18SrRNA مثبت شده بود، با پرایمرهای اختصاصی To-S (P6) و Tbs-A (P4) منشعب از ژن مذکور تحت آزمایش Semi-nested PCR قرار بگیرند.

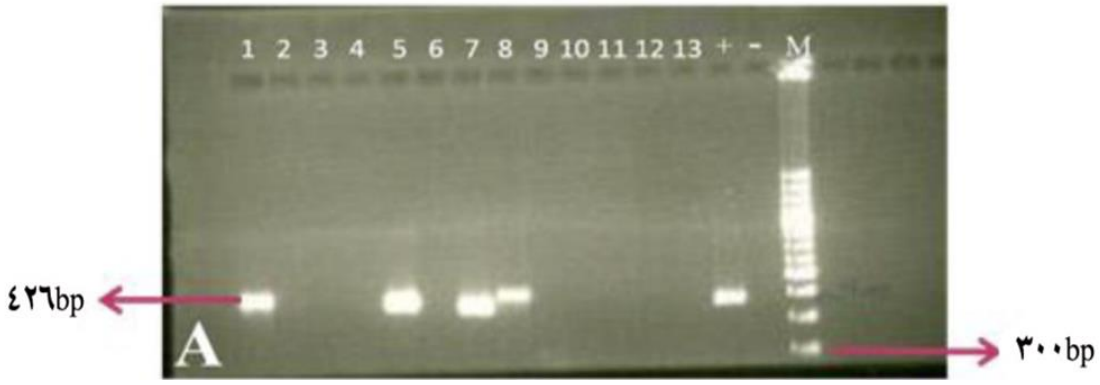
اندازه محصول در این مرحله برای *تیلریا اوریتتالیس* ۲۳۵ جفت باز خواهد بود (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار (SPSS Inc.'Chicago'IL'USA) نسخه ۲۲ به‌طور توصیفی و تحلیلی مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تحلیل داده‌ها از آزمون «مربع کای» (Chi square test) استفاده گردید. p=۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری در نظر گرفته شد. جهت تعیین درجه همبستگی بین دو روش مولکولی و روش میکروسکوپی در این بررسی، «ضریب توافق کاپا» محاسبه شد.

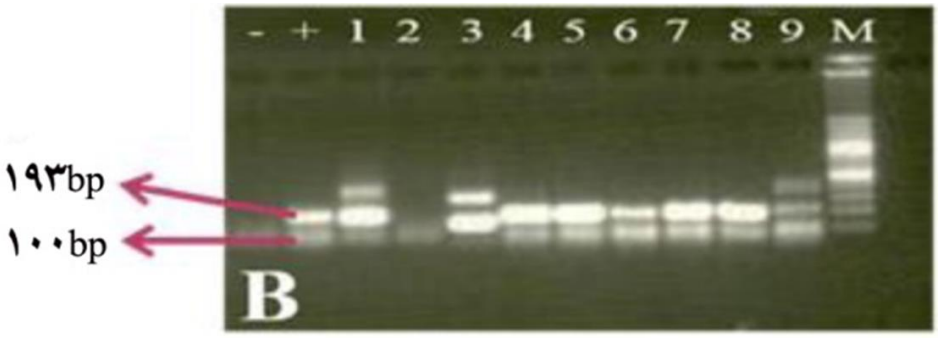
یافته‌ها

- **مطالعه میکروسکوپی**: آشکال پیروپلاسمی تیلریا در نمونه‌های ٤ رأس دام بالغ از ۲۹۱ رأس گاومیش (۱/۳۷ درصد)، ۲ رأس دام نر (۱ درصد) و ۲ رأس دام ماده (۲ درصد) مشاهده شد.

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



شکل ۲- نتایج تکثیر DNAهای استخراج‌شده با پرایمرها



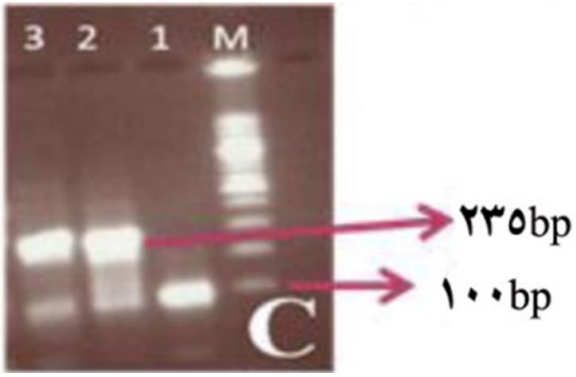
شکل ۳- نتایج تفکیک DNA *تیلریا آنولاتا* با پرایمرهای مربوطه

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

		آلودگی در روش میکروسکوپی		
		مثبت	منفی	جمع
آلودگی در روش مولکولی	مثبت	٤	۰	٤
	منفی	۰	۲۸۷	۲۸۷
	جمع	٤	۲۸۷	۲۹۱

حساسیت و ویژگی روش میکروسکوپی در مقایسه با روش مولکولی (جدول ۳) به ترتیب یک و یک بود و ارزش اخباری موارد مثبت و منفی روش میکروسکوپی به ترتیب یک و یک برآورد شد. شیوع ظاهری و واقعی آلودگی به *تیلریا آنولاتا* در روش مولکولی به ترتیب ۱/۳۷ درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۳۷-۱/۳۷ درصد) و یک درصد (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲/۳-۰ درصد) بود. ضریب توافق کاپا بین دو روش مولکولی و روش میکروسکوپی معادل ۱۷/۰۵ به‌دست آمد که نشان‌دهنده وجود همبستگی ۱۰۰ درصد بین این دو روش در تشخیص آلودگی گاومیش به *تیلریا آنولاتا* می‌باشد.

همچنین این مطالعه نشان داد که دو رأس (۰/٦٨ درصد) گاومیش ماده بالغ (دو درصد) به طور هم زمان به *تیلریا اورینتالیس* نیز آلوده بوده‌اند (شکل ٤). آلودگی به گونه های *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* برابر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲/۳-۲/۲ درصد) بود ($p<0.05$).



شکل ٤- نتایج تفکیک DNA *تیلریا اورینتالیس* با پرایمرهای مربوطه

از لحاظ حضور انگل به تفکیک شهرها، آلودگی به *تیلریا اورینتالیس* در گاومیش‌های ارومیه اثبات گردید ولی این تک‌یاخته در نمونه‌های شهرهای سلماس و مهاباد و نقده مشاهده نشد. شیوع مولکولی *تیلریا آنولاتا* در شهرهای ارومیه و سلماس به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ درصد بود. شیوع مولکولی *تیلریا اورینتالیس* نیز در شهر ارومیه ۲/۲ درصد بود. در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای ارتباط معنی‌داری را بین آلودگی این دو منطقه به انگل نشان نداد. ارتباط معنی‌داری بین موقعیت جغرافیایی و آلودگی مشاهده نگردید (جدول ٤).

جدول ٤- نتایج تعیین مولکولی تک‌یاخته به تفکیک اقلیم مناطق استان

نوع و محل منطقه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	درصد آلودگی
خشک: مهاباد، سلماس	١٤٦	٢	١/٣
مرطوب: ارومیه، نقده	١٤٥	٤	٢/٧

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، ارتباط معنی داری را بین آلودگی این دو منطقه به *تیلریا آنولاتا* نشان نمی دهد(جدول ٥).

جدول٥- نتایج تعیین مولکولی *تیلریا آنولاتا* به تفکیک اقلیم مناطق استان

نوع و محل منطقه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	درصد آلودگی
خشک: مهاباد، سلماس	١٤٦	٢	١/٣
مرطوب: ارومیه، نقده	١٤٥	٢	١/٣

در نتایج تفکیکی بر اساس مناطق خشک و مرطوب استان، آزمون مربع کای، نیز ارتباط معنی‌داری را بین آلودگی این دو منطقه به *تیلریا اورینتالیس* نشان نداد (جدول ٦).

جدول ٦- نتایج تعیین مولکولی *تیلریا اورینتالیس* به تفکیک اقلیم مناطق استان

نوع و محل منطقه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده در این منطقه	درصد آلودگی
خشک: مهاباد، سلماس	١٤٦	٠	٠/٠٠٠
مرطوب: ارومیه، نقده	١٤٥	٢	١/٣

بحث و نتیجه‌گیری

این گزارش، نخستین گزارش آلودگی گاومیش به *تیلریا اورینتالیس* توسط روش مولکولی در ایران است. همچنین نتایج آزمایش‌های مولکولی نشان داد که *تیلریا آنولاتا* شایع‌ترین گونه انگل در گاومیش‌های استان آذربایجان‌غربی می‌باشد. در این بررسی، برای اولین بار آلودگی هم‌زمان با گونه‌های *تیلریا اورینتالیس* و *تیلریا آنولاتا* در گاومیش‌های منطقه شمال‌غربی ایران مشاهده شد. پیش از این، آلودگی هم‌زمان با گونه‌های *تیلریا اورینتالیس* و *تیلریا آنولاتا فقط* در گاو با روش مولکولی در ایران گزارش شده بود (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011). *تیلریا اورینتالیس* نخستین بار در گاو بومی ایران توسط روش سرمی تفکیک و گزارش شده بود (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984). یافته‌های ما در موافقت با نتایج پژوهش اویلنبرگ و هاشمی فشارکی است که انتقال *تیلریا اورینتالیس* را در گاوهای شمال ایران، به وسیله کنه *همافیزالیس پونکتاتا* گزارش نموده بودند (Hashemi- Brown, 1990; Fesharaki, 1988; Ilhan *et al*., 1998). علاوه بر این، حضور *تیلریا اورینتالیس* در استان گلستان واقع در شمال ایران، می‌تواند فرضیه انتشار گسترده این تک یاخته را در بخش‌های شمالی کشور تقویت کند (Hoghooghi-Rad *et al*., 2011). بالاترین میزان آلودگی دام‌ها به *تیلریا آنولاتا* در ایران در استان خوزستان تا ٦٥/٨٣ درصد و در استان مجاور شرقی آن، کهگیلویه و بویر احمد تا ٥٧/٤٤ درصد در سال ١٣٨٩ گزارش گردیده است که در این مورد، احتمال انتشار آلودگی انگلی در اثر حمل و نقل دام در همسایگی استان‌ها و در مسافت نزدیک، به ذهن خطور می کند (Safarpoor-Dehkordi *et al*., 2012).

البته بر اساس بررسی‌ها، گونه *تیلریا آنولاتا* در گاوهای شرق ترکیه، در مجاورت شمال استان آذربایجان‌غربی با فراوانی ٤٥ درصد و گونه‌های گروه *تیلریا سرجنتی*، *تیلریا بافلی* و *تیلریا اورینتالیس* با فراوانی ٧ درصد وجود دارند (Aktas *et al*., 2006).

همچنین در منطقه کردستان کشور عراق، واقع در مجاورت شهرهای جنوبی استان، میزان آلودگی گاوها به *تیلریا آنولاتا* با روش مولکولی ٦٨/٩ درصد گزارش شده است (Al-Saeed *et al*., 2010). احتمال تأثیر حمل و نقل در مسافت نزدیک، بر انتشار این انگل از طریق کنه ناقل در بین دام‌های منطقه، بعید به‌نظر نمی‌رسد. وجود آلودگی در کشور ترکیه به *تیلریا اورینتالیس* و مرز طولانی استان آذربایجان‌غربی با کشور ترکیه (٤٨٨ کیلومتر) و حمل‌ونقل تجاری در مسیری به کوتاهی فاصله ٥٥ کیلومتر در این ناحیه، شاید دلیل پراکندگی *تیلریا اورینتالیس* درگاومیش‌های بومی شهر

ارومیه باشد. به عبارت دیگر احتمال می‌رود کنه‌های غیربومی آلوده، با خون‌خواری در گاومیش‌های بومی، تک‌یاخته‌ها را منتقل کرده باشند. البته این فرضیه برای اثبات، نیازمند رهیافت‌های مختلف تشخیصی در دام‌هایی است که عازم و راهی ایران می‌باشند.

فراوانی بیماری تیلریوز در میان دام‌ها به عواملی از قبیل رفتار زیرگونه‌های جغرافیایی انگل، نژاد دام، مبدأ انتقال دام، سن و وضعیت بدنی دام (بارداری، زایمان و غیره) و همچنین تغییرات ناگهانی محیط مربوط می‌شود. اضطراب زیاد و کاهش توان دستگاه ایمنی نیز می‌تواند باعث تبدیل آلودگی به بیماری بالینی گردد (Safarpoor-Dehkordi *et al*., 2012). کارشناسان تخمین می‌زنند که کنه‌ها در هر سال به میزان ده‌ها میلیارد دلار در دنیا خسارت ایجاد می‌کنند. در این میان، ابتلا به تیلریوز دهه‌هاست که باعث ضررهای زیادی در صنعت دامداری ایران می‌گردد (Hashemi-Fesharaki, 1988; Hashemi-Fesharaki *et al*., 1998).

ناگفته نماند که زیان‌های اقتصادی ناشی از خانواده تیلریده، تاکنون در استان آذربایجان‌غربی تخمین زده نشده است. البته برخی کارشناسان حدس می‌زنند که در اغلب موارد در گاومیش بومی، این آلودگی انگلی به صورت تحت درمانگاهی بوده و یا حتی بدون نشانه بالینی می‌باشد. بدین ترتیب دام آلوده، تبدیل به «مخزن» انگل می‌شود که حتی در گسترش خونی آن، شکل پیروپلاسمی تک‌یاخته قابل مشاهده است. اهمیت دامی که به مخزن تک‌یاخته تبدیل می‌شود در آن است که کنه ناقل را آلوده کرده و سبب انتشار گسترده این انگل توسط آن کنه، به مدت چندین سال به دام‌های پاک می‌گردد(Ilhan *et al*., 1998; Brown, 1990). آب و هوای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری ایران، برای انتشار کنه‌های سخت جنس هیالوما به‌عنوان ناقل اصلی این انگل مناسب می‌باشد (Ranjbar-Bahadori *et al*., 2007; Tavassoli, 2006). خاطر نشان می‌گردد که گروه *تیلریا سرجنتی*، *تیلریا بافلی* و *تیلریا اوریتتالیس* می‌توانند توسط کنه‌های هیالوما، همافیزالیس و حتی ریپی‌سفالوس نیز منتقل شوند (Savini *et al*., 1998).

در بررسی حاضر، بین ابتلا به تک‌یاخته با وضعیت آب و هوای شهرهای استان ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید. بنابراین به‌نظر می‌رسد تأثیر اقلیم در بوم‌شناسی و فیزیولوژی کنه‌ها برای چهار شهر مورد مطالعه، کمابیش یکسان باشد و احتمالاً باید علل دیگری را در تفاوت میزان آلودگی در آنها مؤثر دانست. لازم به ذکر است که معمولاً در پاتوژنز بیماری تیلریوز، ۱۳-۱۱ روز بعد از گزش، فرم پیروپلاسمی در گسترش خون دام دیده می‌شود و در این فاصله اگر از دام مذکور، نمونه خونی جهت بررسی فرم مذکور اخذ شود، نتیجه منفی خواهد بود. در صورتی‌که با مطالعه لنفوسیت‌های داخل گردش خون در این بازه زمانی، می‌توان فرم شیزونتی را مشاهده نمود. لذا عدم مطالعه لنفوسیت‌های جریانی می‌تواند نتایج منفی کاذب را به دنبال داشته باشد (Ahmad and Melhorn, 1999).

انگل‌های گروه *تیلریتا سرجنتی*، *تیلریا بافلی* و *تیلریا اوریتتالیس* در سراسر دنیا پراکنده هستند. خود *تیلریا اوریتتالیس* در چهار ژنوتیپ دسته‌بندی شده است: ایکدا (ikeda)، چیتوز (chitose)، بافلی (buffeli) و تیپ ٤ (type 4).

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

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

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

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

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

تیلریا اورینتالیس در هنگام نمونه‌برداری زمستانی (متعاقب اوج فعالیت پاییزی کنه‌های جنس همافیزالیس در منطقه) در شکل آلودگی مزمن وجود داشته است. البته گونه بسیار بیماری‌زای *تیلریا آنولاتا* به‌خاطر فعالیت دائمی کنه‌های جنس هیالوما معمولاً حضور بومی دارد که این کنه ها، گروه *تیلریا سرجنتی/بافلی/اورینتالیس* را هم منتقل می‌کنند (Uilenberg and Hashemi-Fesharaki, 1984).

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

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

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

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

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