مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۱۶-۸
مقاله پژوهشی

تشخیص تفریقی *تیلریا لستوکاردی*، *تیلریا اویس* و *تیلریا آنولاتا* در گوسفند با روش مولکولی PCR

روح اله فتاحی[1]، پرویز شایان[1]، الهه ابراهیم‌زاده[2]، نرگس امینی نیا[1]

[1] مرکز کنه و بیماری‌های منتقله از آن، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران
[2] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

10.22059/jvr.2017.241975.2702
تاریخ دریافت: ۲۳ شهریور ماه ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۶ آذر ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینهٔ مطالعه: تیلریوز گوسفندی یک بیماری تک‌یاخته‌ای مهم در گوسفند و بزها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد که باعث ضرر اقتصادی فراوانی در صنعت دام‌پروری می‌شود.

هدف: هدف از این مطالعه، تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا در گوسفند با استفاده از روش PCR بود.

روش‌کار: تعداد ۲۰۰ نمونه خون گوسفند جهت تشخیص و تفریق گونه‌های تیلریا مورد بررسی قرار گرفتند. از نمونه‌های خون، استخراج DNA انجام گرفت و نمونه‌های DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که از روی سه ژن 18S rRNA، TamS1 و TaSp طراحی شده بودند تکثیر داده شدند.

نتایج: در این مطالعه، از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۴۲ نمونه (۲۱ درصد) آلوده به جنس تیلریا بودند و هیچ‌کدام از نمونه‌ها آلودگی به بابزیا نداشتند. همچنین از این ۴۲ نمونه مثبت، تعداد ۲۴ نمونه (۵۷/۱ درصد) فقط آلودگی به گونه *تیلریا اویس*، تعداد ۱۲ نمونه (۲۸/۵ درصد) فقط آلودگی به *تیلریا لستوکاردی* و ۲ نمونه (۴/۷ درصد) فقط آلودگی به *تیلریا آنولاتا* داشتند. ۴ نمونه (۹/۵ درصد) نیز آلودگی هم‌زمان به *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* داشتند. نتایج تعیین توالی نشان داد که محصولات PCR ژن 18S rRNA *تیلریا لستوکاردی* به ترتیب شباهت ۹۹ و ۹۵ درصدی با محصولات PCR ژن 18S rRNA *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اویس* دارد. ژن TamS1 *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا* شباهت ۸۶ درصدی را نشان دادند. همچنین ژن TaSp *تیلریا اویس* در مقایسه با *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا لستوکاردی* به ترتیب شباهت ۹۶ و ۸۶ درصدی را نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه سه ژن تحت آزمایش در بررسی حاضر نشان داد که می توان از ژن های TamS1 و TaSp به منظور تشخیص اختصاصی تیلریا با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تیلریا، تیلریوز، PCR، تشخیص تفریقی، گوسفند

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول *پرویز شایان، مرکز کنه و بیماری‌های منتقله از آن، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران*
پست الکترونیکی: *pshayan@ut.ac.ir*

مقدمه

گونه‌های *تیلریا*، نشخوارکنندگان اهلی و وحشی را در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری آلوده می‌کنند. تاکنون حداقل ۶ گونه تیلریا در نشخوارکنندگان کوچک گزارش‌شده است که شامل سه گونه بیماریزا می‌باشد. *تیلریا لستوکاردی* که عامل تیلریوز بدخیم می‌باشد و *تیلریا لونشونی* و *تیلریا اولینبرگی* که به‌عنوان عوامل بیماریزا در گوسفندان چین گزارش‌شده‌اند. اما گونه‌های غیر بیماریزا یا بیماریزای خفیف شامل *تیلریا اویس*، *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا سپارتا* می‌باشند (۱۳،۱۴،۴۰).

انگل تیلریا مشابه دیگر تک‌یاخته‌های *اپی‌کمپلکسا* دارای چرخه زندگی پیچیده می‌باشد. که شامل ۳ مرحله اسپروگونی، مروگونی و گامتوگونی می‌باشد (۱۶). تعدادی از گونه‌های کنه‌ها ازجمله هیالوما، همافیزالیس، آمبلیوما و رپی‌سفالوس

اسپروزوئیت‌های این تک‌یاخته را به میزبانان پستاندار منتقل می‌کنند (۱،۱۶،۴۰).

در ایران تاکنون در نشخوارکنندگان کوچک گونه‌های *تیلریا لستوکاردی*، *تیلریا اویس* و *تیلریا آنولاتا* گزارش‌شده است. *تیلریا لستوکاردی* در نقاط مختلف ایران خصوصاً مناطق غرب و جنوب غربی گزارش‌شده است درحالی‌که *تیلریا اویس* در تمام کشور مشاهده‌شده است (۱۳،۱۴،۴۰). *تیلریا آنولاتا* نیز اخیراً در چند مطالعه در گوسفند و بز در ایران گزارش‌شده است (۴۰، ۱۷).

تیلریوز باعث ضرر و زیان اقتصادی فراوانی در صنعت دام‌پروری می‌شود. عمده‌ترین ضرر اقتصادی ناشی از تیلریا *لستوکاردی*، مرگ‌ومیر حاصل از آلودگی با این‌گونه تیلریا می‌باشد (۵،۱۳). عامل انتقال این‌گونه تیلریا کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* می‌باشند (۱۵،۳۹). عده‌ای از محققین معتقدند که تیلریا *لستوکاردی* به‌وسیله *رپی‌سفالوس بورسا* و احتمالاً *رپی‌سفالوس سانگوئی* نوس نیز منتقل می‌شود (۲۷). اما *تیلریا اویس* به‌وسیله گونه‌های کنه *رپی‌سفالوس بورسا* (۱)، *رپی‌سفالوس اورتسی* (۲۴) و *رپی‌سفالوس سانگوئی نوس* (۳۷) منتقل می‌شود (۲۶).

به‌منظور تشخیص تیلریوز روش‌های مختلفی استفاده شده است ازجمله نشانه‌های بالینی، آنالیز میکروسکوپی خون با رنگ‌آمیزی گیمسا، تست‌های سرولوژیکی و روش‌های مولکولی بر اساس آنالیز DNA (۲۲،۳۵). روش‌های مولکولی ازجمله PCR جزو روش‌های بسیار مناسب جهت تشخیص و تفریق گونه‌های تیلریا می‌باشد (۹،۲۲).

هدف از این مطالعه، بررسی میزان آلودگی به گونه‌های تیلریا و تشخیص و تفریق آن‌ها با استفاده از سه ژن 18S rRNA، TamS1 و TaSp و مقایسه تفاوت‌های بین آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌کار

نمونه‌های خون: در این مطالعه تعداد ۲۰۰ نمونه خون گوسفند موردبررسی قرار گرفت که در گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی جمع‌آوری‌شده بود. نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد نگه‌داری شدند که قبل از استخراج DNA به‌طور کامل الکل گیری شدند.

استخراج DNA: عملیات استخراج DNA با استفاده از کیت (DNA extraction Kit, MBST, Iran) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به‌طور خلاصه، به هر ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه خون ۱۸۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده اضافه گردید. سپس به این مجموعه ۲۰ میکرو لیتر پروتئیناز K جهت دناتوره کردن پروتئین‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به هر نمونه ۳۶۰ میکرو لیتر محلول بایندینگ اضافه شد و بعد از ورتکس کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اضافه کردن ۲۷۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ و ورتکس کردن، کل این مجموعه به ستون‌های MBST ریخته شدند و با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. بعد از دو بار شستشو با بافر شستشو، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر بافر حل‌کننده و انکوبه کردن آن ها در دمای آزمایشگاه، با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد و DNA استخراج گردید. نمونه‌های DNA تا مراحل بعدی در دمای انجماد ۲۰- نگه‌داری شدند.

روش PCR: در مطالعه حاضر به‌منظور تائید استخراج صحیح DNA، با استفاده از پرایمرهای P1/P2 مستخرج از ژن بتا اکتین گوسفندی (شماره دسترسی در ژن بانک U39357) PCR انجام شد. برای انجام PCR، ۱۰ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۲۰ میکروملار)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار از هر نوکلئوتید)، ۳ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر ۱۰x PCR buffer و ۰/۵ میکرولیتر ۲/۵ U Taq polymerase(سیناژن، ایران) در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (MWG Biotech, Germany) با استفاده از برنامه زیر انجام گرفت.

۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی کامل دو رشته DNA، سپس در ۳۴ سیکل به ترتیب در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (جهت جداسازی ثانویه DNA)، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (جهت اتصال پرایمرها به قسمت مکمل)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه (جهت انجام واکنش همانندسازی) صورت پذیرفت. سپس یک سیکل به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جهت همانندسازی کامل) انجام شد. محصول PCR مورد انتظار با استفاده از این پرایمرهای ژن بتا اکتین گوسفندی bp ۶۸۶ بود.

تکثیر ژن 18S rRNA تیلریا: به‌منظور تشخیص نمونه‌های خون آلوده به گونه‌های تیلریا و بابزیا قسمتی از ژن 18S rRNA

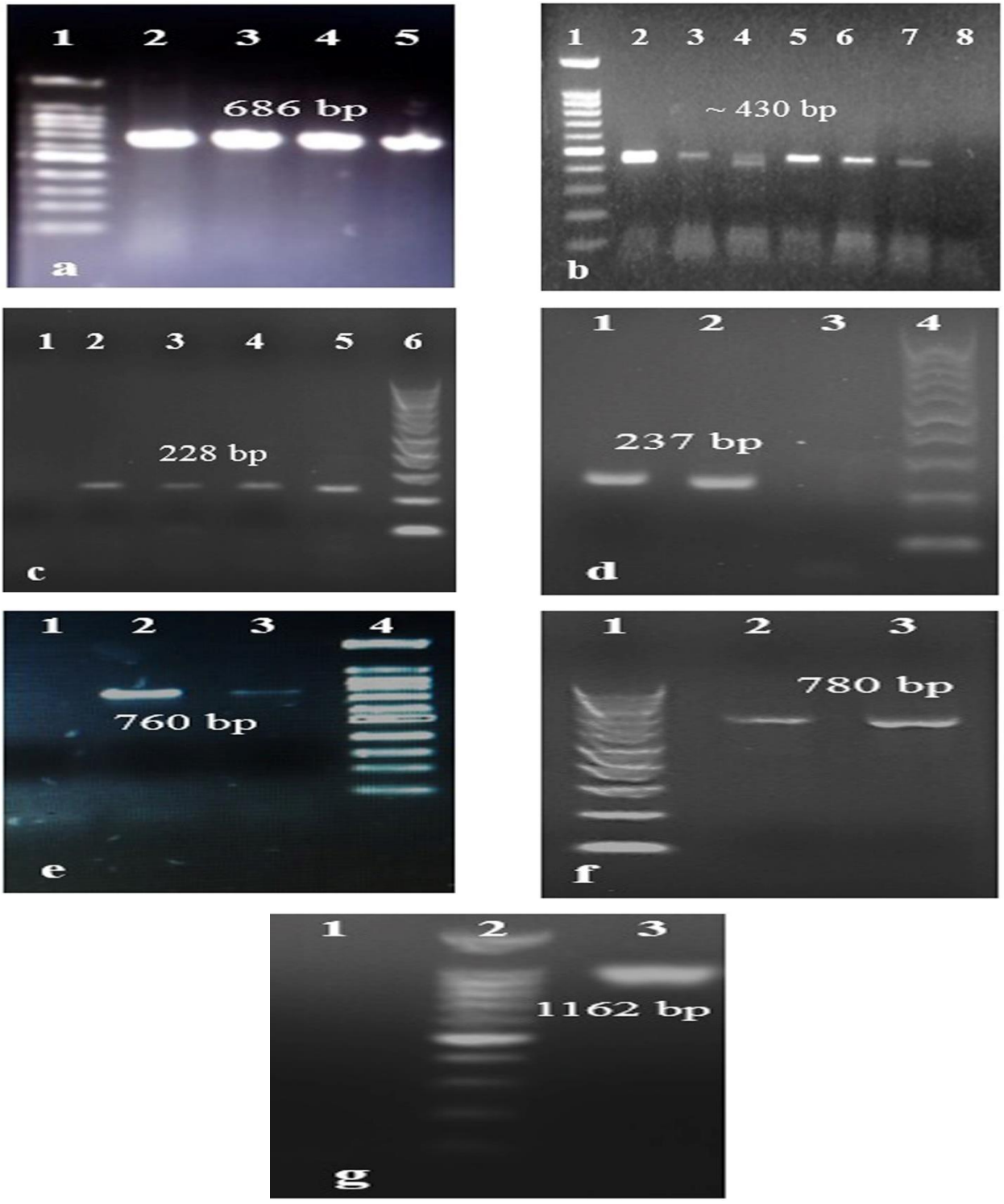
با استفاده از پرایمرهای P3/P4 تکثیر داده شدند. این جفت پرایمر بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن 18S rRNA طراحی گردید که در همه‌ی گونه‌های تیلریا و بابزیا مشترک هستند و می‌توان با این جفت پرایمر جنس تیلریا را از بابزیا تفریق نمود. واکنش PCR مشابه با ژن بتا اکتین انجام شد با این تفاوت که دمای آنیلینگ برای پرایمرهای P3/P4 در محدوده ۵۴ درجه سانتی‌گراد بود. محصول PCR مورد انتظار برای گونه‌های تیلریا bp ۴۲۶-۴۳۰ و برای گونه‌های بابزیا bp ۳۸۹-۴۰۲ بود.

Semi-nested PCR: پس از تشخیص گونه‌های تیلریا، روی محصولات PCR حاصل از پرایمرهای P3/P4 روش Semi-nested PCR جهت تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا انجام شد. بدین منظور دو پرایمر فوروارد شامل P5 که اختصاصی گونه‌ی *تیلریا اویس* می‌باشد و P6 که اختصاصی گونه‌های *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا* می‌باشد. پرایمر P4 به‌عنوان ریورس استفاده شد. محصول PCR مورد انتظار برای پرایمرهای P5/P4 و P6/P4 به ترتیب bp ۲۲۸ و bp ۲۳۷ بود. همچنین دمای آنیلینگ برای هر دو جفت پرایمر ۵۴ درجه سانتی‌گراد بود.

PCR روی ژن Tams1: با توجه به اینکه با روش Semi-nested PCR و توسط ژن 18S rRNA نمی‌توان *تیلریا آنولاتا* را از *تیلریا لستوکاردی* تفریق کرد. جهت تفریق این دو گونه تیلریا از ژن Tams 1 استفاده شد. بدین منظور دو پرایمر فوروارد و یک پرایمر ریورس مشترک بین دو گونه *تیلریا* روی ژن مذکور طراحی شد. پرایمر P7 که اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* می‌باشد (شماره دسترسی در بانک ژنتیک AJ006448.1)، پرایمر P8 که اختصاصی *تیلریا آنولاتا* می‌باشد (شماره دسترسی در بانک ژنتیک AB917302.1) و پرایمر P9 که پرایمر ریورس می‌باشد و بین ژن Tams1 هر دو گونه تیلریا *لستوکاردی* و *آنولاتا* مشترک می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت پرایمرهای P7/P9 و P8/P9 به‌طور جداگانه و به ترتیب با دمای آنیلینگ ۶۰ و ۵۴ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. محصول PCR مورد انتظار روی ژن Tams1 برای *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا* به ترتیب ۷۶۰ و bp ۷۸۰ بود.

جدول ۱. لیست پرایمرهای استفاده شده.

نام پرایمر	نام ژن	شماره دسترسی	توالی نوکلئوتیدی	محصول PCR (bp)
P1	ovine β-actin	U39357	5′-ATCACTGCCCTGGCACCCAG-3′	686
P2			5′-CTGGAGACACTGAGCAGTCTG-3′	
P3	18S rRNA	AF081135 GU726904	5′-CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3′	*Theileria* spp. 426-430
P4		AY260178	5′-CTAAGAATTTCACCTCTGACA-3′	*Babesia* spp. 389-402
P5		AF081135	5′- CTTTACGAGTCTTTGCATTG-3′	*T. ovis* 228
P6		GU726904	5′- ATTGCTTGTGTCCCTCCG-3′	*T. lestoquardi* 237
P7		AJ006448.1	5′-GTGCCGCAAGTGAGTCA-3′	*T. lestoquardi* 760
P8	ms1	AB917302.1	5′-ATGCTGCAAATGAGGAT-3′	*T. annulata* 780
P9		AJ006448.1	5′-GGAATGATGAGAAGACGATGAG-3′	common reverse primer
P10	TaSp	AJ316260.1	5′-CACATATCCAAGTTTCAGTC-3′	1162
P11		AY274335	5′-TTCGTTAATGCGAGAAAAAGAG-3′	common reverse primer



تصویر ۱. نتایج PCR روی ژن‌های β-actin، 18S rRNA، TamS1 و TaSp گونه‌های تیلریا. a. تکثیر ژن بتا اکتین با استفاده از پرایمرهای (P1/P2). ۱: مارکر 100 bp، ۲، ۳، ۴، ۵: محصول PCR حاصل از جفت پرایمر P1/P2. b. تکثیر ژن 18S rRNA تیلریا با استفاده از جفت پرایمر (P3/P4). ۱: مارکر 100 bp. ۲ تا ۷: محصول PCR حاصل از جفت پرایمر P3/P4. ۸: کنترل منفی. c. محصول واکنش Semi-nested PCR حاصل از جفت پرایمر (P5/P4). ۱: کنترل منفی. ۲ تا ۵: محصول PCR حاصل از پرایمرهای P5/P4 که اختصاصی *تیلریا اویس* می‌باشند. ۶: مارکر 100 bp. d. محصول واکنش Semi-nested PCR حاصل از جفت پرایمر (P6/P4). ۱ و ۲: محصول PCR حاصل از پرایمرهای P6/P4 که اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* یا *تیلریا آنولاتا* می‌باشند. ۳: کنترل منفی. ۴: مارکر 100 bp. e. ۱: کنترل منفی. ۲ و ۳: تکثیر ژن TamS1 با جفت پرایمر P7/P9 که اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* می‌باشد. ۴: مارکر 100 bp. f. ۱: مارکر 100 bp. ۲ و ۳: تکثیر ژن TamS1 با جفت پرایمر P8/P9 که اختصاصی *تیلریا آنولاتا* می‌باشد. g. ۱: مارکر 100 bp. ۲: تکثیر ژن TaSp تیلریا با استفاده از جفت پرایمر P10/P11.

تکثیر ژن TaSp: پس از تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا با استفاده از روش‌هایی که توضیح داده شد؛ PCR بر روی ژن TaSp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن، روی نمونه‌های آلوده به گونه‌های *تیلریا لستوکاردی*، *تیلریا اویس* و *تیلریا آنولاتا* انجام پذیرفت. بدین منظور با استفاده از جفت پرایمر P10 و P11 که مشترک بین سه گونه ذکرشده می‌باشد، ژن TaSp این‌گونه‌ها تکثیر داده شد.

اطلاعات مربوط به پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

تعیین توالی نوکلئوتیدی: تعداد دو نمونه از هرکدام از محصولات PCR گونه‌های مختلف تیلریا حاصل از ژن‌های 18S rRNA، Tams1 و TaSp، جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

نتایج

در مورد تعدادی از DNA های استخراج‌شده با استفاده از جفت پرایمر P1/P2 ژن بتا اکتین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و DNAهای استخراج‌شده مورد تائید قرار گرفتند (تصویر ۱،a).

سپس به‌منظور یافتن نمونه‌های آلوده به گونه‌های تیلریا و بابزیا، همه‌ی نمونه DNA های استخراج‌شده با استفاده از جفت پرایمر P3/P4 اختصاصی ژن 18S rRNA، تکثیر داده شدند. از ۲۰۰ نمونه موردبررسی، ۴۲ نمونه آلوده به گونه‌های تیلریا بودند و آلودگی به بابزیا مشاهده نشد (تصویر ۱، b). به‌منظور تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا، محصولات PCR حاصل از جفت پرایمر P3/P4، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش Semi-nested PCR تکثیر داده شدند. بدین‌صورت که با استفاده از پرایمرهای P5 (اختصاصی *تیلریا اویس*) و P6 (اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا*) به‌عنوان پرایمرهای فوروارد و پرایمر P4 به‌عنوان پرایمر ریورس بدین منظور استفاده شدند. از ۴۲ نمونه آلوده به تیلریا که با روش Semi-nested PCR بررسی شدند، ۲۴ نمونه با جفت پرایمر P5/P4 تکثیر داده شدند یعنی ۲۴ مورد از ۴۲ نمونه موردبررسی، *تیلریا اویس* بودند (تصویر ۱، c). ۱۴ نمونه نیز با استفاده از جفت پرایمر P6/P4 مثبت شدند که نشان دهنده آلودگی به *تیلریا لستوکاردی* یا *تیلریا آنولاتا* می‌باشند (تصویر ۱، d). ۴ نمونه نیز آلودگی توأم *تیلریا اویس* با *تیلریا لستوکاردی* یا *تیلریا آنولاتا* داشتند یعنی هم با جفت پرایمر P5/P4 و هم P6/P4 مثبت بودند.

با توجه به شباهت بسیار بالای ژن 18S rRNA در *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا*، به‌منظور تفریق این دو گونه از هم، از ژن Tams1 استفاده گردید. بدین منظور ۱۴ نمونه‌ای که با استفاده از ژن 18S rRNA و روش Semi-nested PCR، *تیلریا لستوکاردی* یا *تیلریا آنولاتا* مثبت بودند و همچنین ۴ نمونه‌ای که آلودگی توأم *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* یا *تیلریا آنولاتا* داشتند با استفاده از پرایمرهای P7/P9 و P8/P9 که به ترتیب اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا* بودند، تحت PCR قرار گرفت. از ۱۴ نمونه‌ی موردبررسی، ۱۲ نمونه به *تیلریا لستوکاردی* و ۲ نمونه به *تیلریا آنولاتا* آلوده بودند. همچنین با استفاده از این دو جفت پرایمر، ۴ نمونه‌ای که آلودگی توأم داشتند بررسی شد و مشخص گردید که هر ۴ نمونه آلوده به *تیلریا لستوکاردی* می‌باشند (تصویر ۱، e,f). لازم به ذکر است که هیچ‌کدام از نمونه‌های آلوده به *تیلریا اویس* با استفاده از این دو جفت پرایمر تکثیر داده نشدند و PCR آن‌ها منفی شد.

پس از تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا با استفاده از روش‌های Semi-nested PCR روی ژن 18S rRNA و PCR روی ژن Tams1، ژن TaSp هرکدام از این نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی P10/P11 تکثیر داده شد (تصویر ۱، g).

در پایان، تعداد ۲ نمونه از هرکدام از محصولات PCR گونه‌های مختلف تیلریا حاصل از ژن‌های 18S rRNA، Tams1 و TaSp، تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی نشان داد که محصولات PCR ژن 18S rRNA *تیلریا لستوکاردی* به ترتیب شباهت ۹۹ و ۹۵ درصدی با محصولات PCR ژن 18S rRNA گونه‌های *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اویس* دارد. ژن TamS1 *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا آنولاتا* شباهت ۸۶ درصدی را نشان دادند. و مقایسه نتایج تعیین توالی ژن TaSp *تیلریا اویس* در مقایسه با *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا لستوکاردی* شباهت ۹۶ و ۸۶ درصدی را نشان داد. تفاوت عمده ژن TaSp *تیلریا لستوکاردی* در مقایسه با دو گونه تیلریای دیگر در ناحیه N-terminus این ژن مشاهده شد.

بحث

تیلریوز بیماری مهم گوسفندان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد که به‌وسیله تک‌یاخته خونی تیلریا ایجاد می‌شود. این بیماری باعث خسارت‌های اقتصادی فراوان در صنعت دام‌پروری می‌شود (۲۳،۴۰). *تیلریا لستوکاردی* گونه‌ی بسیار بیماریزا در نشخوارکنندگان کوچک است که باعث بروز تیلریوز بدخیم در نقاط مختلف دنیا ازجمله ایران می‌شود (۴،۱۵). یکی دیگر از گونه‌های تیلریا در نشخوارکنندگان کوچک *تیلریا اویس* است که شیوع نسبتاً زیادی در این میزبان‌ها در ایران دارد. *تیلریا اویس* غیر بیماریزا بوده و یا از بیماریزایی بسیار اندکی برخوردار است (۳۱،۳۸،۳۹). اخیراً در چندین مطالعه، *تیلریا آنولاتا* نیز در گوسفند و بز گزارش‌شده است (۱۷،۴۰). این‌گونه نیز در نشخوارکنندگان کوچک غیر بیماریزا می‌باشد (۴). تیلریوز حاد دارای علائم بالینی ازجمله تب بالا، تورم غدد لنفاوی، مشکلات تنفسی و مرگ‌ومیر بالا می‌باشد. هرچند که مرگ‌ومیر بالا بدون علائم بالینی مشخص نیز مشاهده می‌شود (۳۴). تاکنون ۳ گونه *تیلریا* شامل *تیلریا لستوکاردی*، *تیلریا اویس* و *تیلریا آنولاتا* در نشخوارکنندگان کوچک در ایران گزارش‌شده است که دو گونه‌ی *تیلریا لستوکاردی*، *تیلریا اویس* شیوع بالایی در نشخوارکنندگان کوچک در ایران دارند (۴۰، ۱۷).

روش‌های مختلفی برای تشخیص تیلریوز استفاده‌شده است شامل روش‌های میکروسکوپی، روش‌های سرولوژی و روش‌های مولکولی. تشخیص تیلریوز در حال حاضر معمولاً بر اساس علائم بالینی و مشاهده اشکال پیروپلاسمی در گسترش‌های خونی و رنگ‌آمیزی با گیمسا صورت می‌گیرد. از مزایای روش‌های میکروسکوپی می‌توان به‌آسانی، سریع بودن و عدم نیاز به امکانات زیاد نام برد. اما از محدودیت‌های این روش نیز می‌توان به عدم تفریق گونه‌های مختلف *تیلریا*، حساسیت و ویژگی پایین این روش در مقایسه با روش‌های دیگر ازجمله روش‌های مولکولی و نیاز به مهارت و تجربه‌ی بالای فرد آزمایش‌کننده جهت تشخیص درست تیلریوز را برشمرد (۶،۲۲،۳۶،۳۸).

از روش‌های تشخیصی دیگر تیلریوز می‌توان به روش‌های سرولوژیکی اشاره کرد. تاکنون روش‌های سرولوژیکی مختلفی مانند ثبوت کمپلمان (CFT) ایمنوفلورسانت غیرمستقیم (IFAT) و الیزا (ELISA) برای تشخیص تیلریوز استفاده‌شده است. در هرکدام از این روش‌های سرولوژیکی مورداستفاده، از آنتی‌ژن‌های مختلفی استفاده‌شده است ازجمله در ابتدا از شیزونت و اشکال پیروپلاسمی انگل و سپس پروتئین‌های نوترکیب حاصل از ژن‌های مختلف انگل ازجمله TaSp (۳)، TaD (۳۰)، TaSE (۲۹) و TaHSP70 (۳۳) مورداستفاده قرارگرفته‌اند که با نتایج مختلفی همراه بوده‌اند. در مقایسه این پروتئین‌های نوترکیب، تیتر بسیار بالای آنتی‌بادی در برابر پروتئین نوترکیب TaSp در مقایسه با سایر پروتئین‌ها مشاهده‌شده است (۳۳). روش‌های سرولوژیکی روشی مناسب برای تشخیص فاز بیماری تیلریوز می‌باشند و می‌توان با این روش‌ها حیواناتی را که قبلاً مبتلابه تیلریوز شده و بهبودیافته‌اند را از عفونت‌های تازه تفریق نمود. مهم‌ترین مشکل در استفاده از روش‌های سرولوژیکی وجود واکنش‌های متقاطع بین گونه‌های مختلف تیلریا با همدیگر و با برخی انگل‌های تک‌یاخته‌ای خونی دیگر می‌باشد (۷،۱۸،۲۱،۲۲). اما روش‌های مولکولی منطبق بهترین روش برای تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف تیلریا می‌باشند. روش‌های مولکولی مختلفی برای تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا استفاده‌شده است و این روش‌ها دارای حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برای تشخیص تیلریوز می‌باشند. به‌طوری‌که با استفاده از روش PCR می‌توان حضور یک پیروپلاسم را در یک میکرو لیتر خون گوسفند تشخیص داد. این حساسیت بالای تشخیص تیلریا در مطالعات مختلف گزارش‌شده است (۲،۸،۲۰).

در نقاط مختلف دنیا روش‌های مختلف مولکولی شامل روش‌های PCR-RFLP، Real-time PCR، RLB و روش LAMP به‌منظور تشخیص گونه‌های تیلریا استفاده‌شده است (۲۲،۲۵،۲۸،۳۲).

در اکثر مطالعات انجام‌گرفته به‌منظور تفریق گونه‌های تیلریا از ژن 18S rRNA استفاده گردیده است. به‌طور مثال در ایران، در مطالعه‌ای که توسط Heidarpour Bami و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۱۰۰ نمونه خون گوسفند در شرق و جنوب شرق ایران انجام شد با استفاده از روش PCR-RFLP میزان آلودگی به تیلریا را ۵۶ درصد اعلام کردند که از این میزان، ۱۲/۵ درصد آلوده به گونه‌ی *تیلریا اویس* و ۸۷/۵ درصد آلوده به گونه‌ی *تیلریا لستوکاردی* بودند (۱۴).

Zaeemi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که بر روی گوسفندان در شمال و غرب انجام دادند، تعداد ۲۵۰ نمونه خون گوسفند را جهت تعیین گونه‌های تیلریا با روش PCR-RFLP با استفاده از ژن 18S rRNA موردبررسی قراردادند. در این مطالعه از ۲۵۰ نمونه خون موردبررسی با روش PCR، ۸۲ مورد تیلریا مثبت بودند که از این تعداد، ۴۵ و ۳۳ نمونه به ترتیب آلوده به

تیلریا لستوکاردی و *تیلریا اویس* بودند و ۴ نمونه دارای آلودگی توأم *تیلریا لستوکاردی* با *تیلریا آنولاتا* بودند. این مطالعه، اولین گزارش از آلودگی طبیعی گوسفند به *تیلریا آنولاتا* در ایران بود (۴۰).

Shayan و Rahbari در سال ۲۰۰۵، با استفاده از روش PCR، گونه‌های تیلریا و بابزیا را در لام‌های خون رنگ‌آمیزی شده تفریق نمودند. در این مطالعه، ابتدا اقدام به استخراج DNA از لام‌های خونی که با روش گیمسا رنگ‌آمیزی شده بودند کردند. سپس با پرایمرهایی که از روی ژن‌های 18S rRNA، ژن Tams 1- 2 و ژن hsp70 طراحی کرده بودند، DNAهای استخراج‌شده را تکثیر دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از ژن 18S rRNA می‌توان جنس‌های تیلریا و بابزیا را به‌طور دقیق تشخیص و تفریق نمود (۳۶).

در اکثر مطالعات انجام‌شده، به‌منظور تفریق گونه‌های تیلریا با روش PCR در میزبانان مختلف، از ژن 18S rRNA استفاده‌شده است. اما ژن Tams نیز در برخی مطالعات در ایران و سایر نقاط به‌منظور تفریق گونه‌های تیلریا استفاده شده است (۱۰،۱۱،۱۲،۱۹،۳۵).

در مطالعه حاضر گونه‌های تیلریای گوسفند با استفاده از ژن‌های 18S rRNA، TamS1 و TaSp تشخیص تفریقی داده شدند. و مشاهده گردید که می‌توان از ژن‌های TamS1 و TaSP به‌منظور تشخیص اختصاصی یک‌گونه‌ی تیلریا با روش PCR استفاده نمود. بنابراین می‌توان با استفاده از این سه ژن و با طراحی پرایمر اختصاصی، با انجام یک واکنش Multiplex PCR و با حداقل زمان و امکانات به‌صورت اختصاصی گونه‌های تیلریا را از هم تفریق نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از موسسه گروه پژوهشی انتقال سامانه های زیست مولکولی به عالت پشتیبانی مالی و علمی در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. (2006). PCR-based detection of *Theileria ovis* in Rhipicephalus bursa adult ticks. Vet Parasitol, 140(3-4), 259-263. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.005 PMID: 16682122
2. Altay, K., Dumanli, N., Holman, P. J., Aktas, M. (2005). Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. Vet Parasitol, 127(2), 99-104. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.012 PMID: 15631901
3. Bakheit, M., Schnittger, L., Salih, D., Boguslawski, K., Beyer, D., Fadl, M., Ahmed, J. (2004). Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. Parasitol Res, 92(4), 299-302. https://doi.org/10.1007/s00436-003-1055-7 PMID: 14722760
4. Brown, C., Ilhan, T., Kirvar, E., Thomas, M., Wilkie, G., Leemans, I., Hooshmand- Rad, P. (1998). *Theileria lestoquardi* and *T. annulata* in Cattle, Sheep, and Goats: In Vitro and in Vivo Studies. Ann N Y Acad Sci, 849(1), 44-51. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11032.x PMID: 9668448
5. Cicek, H., Cicek, H., Eser, M., Tandogan, M. (2009). Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey. Turkiye Parazitol Derg, 33(4), 273-279.
6. Criado-Fornelio, A. (2007). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia, 49, 39-44.
7. De Vos, A., Roos, J. (1981). The isolation of *Theileria taurotragi* in South Africa. Onderstepoort J Vet. Res, 48, 149-153.
8. d'Oliveira, C., Van Der Weide, M., Habela, M. A., Jacquiet, P., Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol, 33(10), 2665-2669.
9. El Imam, A. H., Taha, K. M. (2015). Malignant ovine theileriosis (*Theileria lestoquardi*): a review. JJBS, 8(3), 165-174.
10. Esmaelizad, M., Niaraki, S. J., Fesharaki, R. H. (2011). Molecular and phylogenetic analysis of the partial tams1 gene sequence of a vaccine strain of Theileria annulata. Braz Arch Biol Technol, 54(6), 1109-1116. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000600005
11. Gubbels, M.-J., d'Oliveira, C., Jongejan, F. (2000). Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. Clin Diagn Lab Immunol, 7(3), 404-411. https://doi.org/10.1128/CDLI.7.3.404-411.2000
12. Habibi, G. (2012). Phylogenetic Analysis of *Theileria annulata* Infected Cell Line S15 Iran Vaccine Strain. Iran J Parasitol, 7(2), 73-81.
13. Hashemi-Fesharki, R. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parassitologia, 39(2), 115-117.
14. Heidarpour Bami, M., Haddadzadeh, H., Kazemi, B., Khazraiinia, P., Bandehpour, M., Aktas, M. (2009). Molecular identification of ovine Theileria species by a new PCR–RFLP method. Vet Parasitol, 161(3), 171-177. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.035
15. Hooshmand-Rad, P., Hawa, N. (1973). Transmission of *Theileria hirci* in sheep by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Trop Anita Hlth Prod, 5(2), 103-109.
16. Irvin, A. (1985). Immunity in theileriosis. Parasitol Today, 1(5), 124-128. https://doi.org/10.1016/0169-

4758(85)90056-0
17. Jalali, S. M., Khaki, Z., Kazemi, B., Rahbari, S., Shayan, P., Bandehpour, M., Yasini, S. P. (2014). Molecular Detection and Identification of *Theileria* Species by PCR-RFLP Method in Sheep from Ahvaz, Southern Iran. Iran J Parasitol, 9(1), 99-106.
18. Jongejan, F., Musisi, F., Moorhouse, P., Snacken, M., Uilenberg, G. (1986). *Theileria taurotragi* in Zambia. Vet Q, 8(3), 261-263. https://doi.org/10.1080/01652176.1986.9694051
19. Kirvar, E., Ilhan, T., Katzer, F., Hooshmand-Rad, P., Zweygarth, E., Gerstenberg, C., Brown, C. G. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. Parasitology, 120 (3), 245-254. https://doi.org/10.1017/S0031182099005466 PMID: 10759082
20. Kirvar, E., Ilhan, T., Katzer, F., Wilkie, G., Hooshmand-Rad, P., Brown, D. (1998). Detection of *Theileria lestoquardi* (hirci) in ticks, sheep, and goats using the polymerase chain reaction. Ann N Y Acad Sci, 849(1), 52-62. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11033.x PMID: 9668449
21. Leemans, I., Hooshmand-Rad, P., Uggla, A. (1997). The indirect fluorescent antibody test based on schizont antigen for study of the sheep parasite *Theileria lestoquardi*. Vet Parasitol. 69(1-2), 9-18. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01098-9
22. Mans, B. J., Pienaar, R., Latif, A. A. (2015). A review of Theileria diagnostics and epidemiology. International Journal for Parasitology: Int J Parasitol Parasites Wildl, 4(1), 104-118. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006
23. Mehlhorn, H., Schein, E., Ahmed, J. S. (1994). Parasitic protozoa. (2st ed.) Blackwell Sciences Ltd. london, UK.
24. Neitz, W. (1972). Experimental transmission of *Theileria ovis* by *Rhipicephalus evertsi mimeticus* and *Rhipiceplialus bursa*. Onderstepoort J Vet Res, 39(2), 83-85.
25. Pienaar, R., Potgieter, F. T., Latif, A. A., Thekisoe, O. M., Mans, B. J. (2011). The Hybrid II assay: a sensitive and specific real-time hybridization assay for the diagnosis of *Theileria parva* infection in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. Parasitology, 138(14), 1935-1944. https://doi.org/10.1017/S0031182011001454
26. Rashidi, A., Razmi, G. (2012). Molecular detection of *Theileria* spp. in sheep and vector ticks in the North Khorasan Province, Iran. Trop Anim Health Prod, 45(1), 299-303. http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0555-z PMID: 22791188
27. Razmi, G. R., Hosseini, M., Aslani, M. (2003). Identification of tick vectors of ovine theileriosis in an endemic region of Iran. Vet parasitol, 116(1), 1-6. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00254-1 PMID: 14519321
28. Salih, D., Liu, Z., Bakheit, M., Arab, A.M., El Hussein, A., Unger, H., G Viljoen., U Seitzer., Ahmed, J. (2008). Development and evaluation of a loop- mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. Transbound Emerg Dis, 55(5- 6), 238-243. https://doi.org/ 10.1111/j.1865-1682.2008.01033.x
29. Schneider, I., Haller, D., Seitzer, U., Ahmed, J. (2003). Identification and characterisation of *Theileria annulata* proteins containing putative signal peptides. Immuno-biology, 208, 278-279.
30. Schneider, I., Haller, D., Seitzer, U., Beyer, D., Ahmed, J. S. (2004). Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. Parasitol Res, 94(6), 405-415. https://doi.org/10.1007/s00436-004-1226-1 PMID: 15490238
31. Schnittger, L., Shayan, P., Biermann, R., Mehlhorn, H., Gerdes, J., Ahmed, J. S. (2000). Molecular genetic characterization and subcellular localization of *Theileria annulata* mitochondrial heat-shock protein 70. Parasitol Res, 86(6), 444-452. https://doi.org/10.1007/s004360050692 PMID: 10894469
32. Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M. J., Beyer, D., Niemann, S., Ahmed, J. S. (2004). Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res, 92(3), 189-196. https://doi.org/10.1007/s00436-003-0980-9 PMID: 14652747
33. Seitzer, U., Beyer, D., Kullmann, B., Bakheit, M., Ahmed, J. (2008). Evaluation of *Theileria annulata* recombinant immunodominant proteins for the development of ELISA. Transbound Emerg Dis, 55(5-6), 244-248. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01030.x PMID: 18666969
34. Shayan, P., Ebrahimzadeh, E., Tageldin, M., Amininia, N., Eckert, B. (2011). Molecular study of sheep malignant theileriosis at Barka region in the sultanate of Oman. Iran J Parasitol, 6(1), 66-72.
35. Shayan, P., Jafari, S., Fattahi, R., Ebrahimzade, E., Amininia, N., Changizi, E. (2016). Identification and characterization of *Theileria ovis* surface protein (ToSp) resembled TaSp in *Theileria annulata*. Parasitol Res, 115(5), 1893-1899. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4929-1 PMID: 26833323
36. Shayan, P., Rahbari, S. (2005). Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. Parasitol Res, 97(4), 281-286. https://doi.org/10.1007/s00436-005-1434-3 PMID: 16007464
37. Telmadarraiy, Z., Oshaghi, M.A., Hosseini-Vasoukolaei, N., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Babamahmoudi, F. Mohtarami, F. (2012). First molecular detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus sanguineus* tick in Iran. Asian Pac J Trop Med, 5, 29-32. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60240-X PMID: 22182639
38. Uilenberg, G. (1981). Theilerial Species of Domestic Livestock. (1st ed.) Martinus Nijhoff Publishers. The Hague, Boston. London, UK.
39. Uilenberg, G. (1997). General review of tick-borne diseases of sheep and goats world-wide. Parassitologia, 39(2), 161-165.
40. Zaeemi, M., Haddadzadeh, H., Khazraiinia, P., Kazemi, B., Bandehpour, M. (2011). Identification of different Theileria species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR–RFLP. Parasitol Res, 108(4), 837-843. https://doi.org/10.1007/s00436-010-2119-0 PMID: 20978792

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 1, 2020
Original Article

Differential Diagnosis of *Theileria lestoquardi, Theileria ovis* and *Theileria annulata* in Sheep, Using Molecular Method, PCR.

Roohollah Fattahi[1], Parviz Shayan[1], Elahe Ebrahimzadeh[2], Narges Amininia[1]

[1]*Research Center Ticks and Tick-borne Diseases, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Deparment of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

10.22059/jvr.2017.241975.2702
Received 14 September 2019, Accepted 7 December 2019

Abstract

BACKGROUND: Ovine theileriosis is an important hemoprotozoal disease of sheep and goats in tropical and subtropical regions which causes high economic loss in the livestock industry.

OBJECTIVES: The aim of this study was the differential detection of *Theileria* species in sheep using PCR method.

METHODS: Two hundred blood samples of sheep were investigated in order to differentially diagnose *Theileria* species. DNA was extracted from blood samples and DNA samples were amplified using specific primers designed for 18S rRNA, TamS1 and TaSp genes.

RESULTS: In this study, from 200 examined samples, 42 samples (21%) were infected by *Theileria* spp. and none of them were infected by *Babesia* spp. Moreover, from these 42 positive samples, 24 samples (57.1%) were only infected by *T. ovis*. 12 samples (28.5%) were only infected by *T. lestoquardi*, 2 samples (4.7%) were only infected by *T. annulata* and 4 samples (9.5%) were simultaneously infected by *T. lestoquardi* and *T. ovis*. The results of nucleotide sequencing showed that PCR product of 18S rRNA from *T. lestoquardi* has 99 and 95% similarity with *T. annulata* and *T. ovis* respectively. *T. lestoquardi* and *T. annulata* showed 86% similarity. Also TaSp gene of *T. ovis* in comparison with *T. annulata* and *T. lestoquardi* showed 96 and 86% similarity, respectively.

CONCLUSIONS: In the present study could be shown that the two genes (TamS1 and TaSp) from examined three genes could be used for *Theileria* species specific diagnosis by PCR.

Keywords: Theileria, Theileriosis, PCR, Differential diagnosis, Sheep

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: pshayan@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-611170710, 21-66933222

How to cite this article:

Fattahi, R., Shayan, P., Ebrahimzadeh, E., Amininia, N. (2020). Differential Diagnosis of *Theileria lestoquardi, Theileria ovis* and *Theileria annulata* in Sheep, Using Molecular Method, PCR, J Vet Res, 75(1), 8-16. https://doi.org/10.22059/jvr.2017.241975.2702

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Results of PCR on β-actin, 18S rRNA, TamS1 and TaSp genes in *Theileria* species. a. 1: Marker 100 bp. 2 to 5: Amplification of extracted DNA from blood samples using primers derived from β-actin gene (P1/P2). b. 1: Marker 100 bp. 2 to 7: Amplification of extracted DNA from blood samples using common primers derived from 18S rRNA gene (P3/P4). 8: Negative control. c. 1 to 5: The *Theileria* -positive PCR products (P3/P4) were amplified using primers (P5/P4) specific for *T. ovis*. 6: Marker 100 bp. d. 1, 2: The *Theileria* -positive PCR products (P3/P4) were amplified using primers (P6/P4) specific for *T. lestoquardi* and *T. annulata*. 3: Negative control. 4: Marker 100 bp. e. 1: Negative control. 2, 3: Amplification of extracted DNA from *Theileria* positive blood samples using primers derived from *T. lestoquardi* ms1 gene (P7/P9). 4: Marker 100 bp. f. 1: Marker 100 bp. 2, 3: Amplification of extracted DNA from *Theileria* positive blood samples using primers derived from *T. annulata* ms1 gene (P8/P9). g. 1: Negative control. 2: Marker 100 bp . 3: Amplification of extracted DNA from *Theileria* positive blood samples using primers P10/ P11 specific for TaSp gene of *Theileria* species.

Table 1. The list of used primers.