Archive of SID

شناسایی مولکولی *تیلریا اویس* (*Theileria ovis*) و *تیلریا لستوکاردی* (*T. lestoquardi*) در کنه‌های ناقل از خانواده‌ی ایکسودیده در استان لرستان

سعید هاشمی[۱*] و خسرو استکی‌اورگانی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

چکیده

تیلریوزیس، بیماری انگلی ناشی از تک‌یاخته‌ی درون سلولی گونه‌های *تیلریا* است که توسط کنه‌های ایکسودیده منتقل می‌شود. شناسایی کنه‌های ناقل در هر منطقه برای ایجاد برنامه‌های منسجم پیش‌گیری علیه این بیماری، ضروری است. بر این اساس، از فروردین تا مرداد ۱۳۹۱ تعداد ۲۱۹ کنه از سطح بدن ۱۵۰ رأس گوسفند با سابقه‌ی تب و کم‌خونی از نقاط مختلف استان لرستان جمع‌آوری شد، در ضمن از خون محیطی این گوسفندان، گسترش‌های خونی نازک تهیه شد. از غدد بزاقی کنه‌ها شامل ۱۵۲ *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، ۱۳ کنه‌ی *ریپی سفالوس بورسا* و ۵۴ کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* DNA استخراج شد. سپس با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی به منظور تکثیر قطعه‌ی ژنی به اندازه‌ی ۵۲۰ جفت باز متعلق به ژن SSurRNA *تیلریا اویس* و یک جفت پرایمر اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* برای تکثیر ژن سطحی مروزوئیت این انگل با اندازه‌ی ۷۸۵ جفت باز آزمایش PCR انجام شد. نتایج PCR نشان داد که ۳۷ نمونه (۲۴/۳۴ درصد) از کنه‌های *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، واجد ژنوم انگل *تیلریا اویس* بودند؛ اما هیچ یک از کنه‌های *ریپی سفالوس بورسا* به این تک‌یاخته، آلودگی نداشتند. هم‌چنین، از ۵۴ کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* ۵ کنه (۹/۲۵ درصد) واجد ژنوم *تیلریا لستوکاردی* بودند. با آزمایش میکروسکوپی گسترش‌های خونی، اشکال پیروپلاسمی گونه‌های *تیلریا* در ۱۹ مورد (۱۲/۶۶ درصد) مشاهده شد. با توجه به گسترش وسیع *ریپی سفالوس سانگوئینوس* نسبت به سایر کنه‌ها به نظر می‌رسد که این کنه احتمالاً عمده‌ترین عامل انتقال *تیلریا اویس* در استان لرستان باشد.

کلمات کلیدی: کنه‌های ایکسودیده، *تیلریا اویس*، *تیلریا لستوکاردی*، لرستان، ایران

مقدمه

تیلریوز، یکی از بیماری‌های انگلی منتقل شده توسط کنه‌های سخت از خانواده‌ی ایکسودیده است که در نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان از جمله ایران انتشار دارد. *تیلریا لستوکاردی* (*تیلریا هیرسی*) عامل شکل حاد بیماری و گونه‌های *تیلریا اویس*، *تیلریا سپراتا* و *تیلریا رکوندیتا*، عوامل تیلریوز تحت حاد در گوسفند و بز اهلی و وحشی می‌باشند (Abdigoudarzi 2013, Hashemi-Fesharaki 1997, Razmi et al. 2003).

کنه‌های ناقل اسپروزوئیت انگل را هنگام خونخواری از طریق بزاق خود به میزبان‌های پستاندار خود، انتقال می‌دهند. بررسی‌هایی که در شرق ایران انجام شده است، نشان می‌دهد که آلودگی گوسفند و بز توسط کنه‌های جنس *ریپی سفالوس* و *هیالوما* صورت می‌گیرد (Estrada-Pena et al. 2004, Heidarpour Bami et al. 2010).

روش‌های سنتی تشخیص تیلریا در میزبان‌های مهره‌دار، براساس تهیه‌ی گسترش از خون محیطی و یا غدد لنفاوی دام همراه با وجود نشانه‌های بالینی، امکان‌پذیر بوده است؛ در حالی که تشخیص انگل در میزبان‌های ناقل با رنگ‌آمیزی غدد بزاقی کنه‌ها با موادی نظیر فولگن یا متیل پیرونین انجام می‌شده است. این روش‌ها غیر اختصاصی هستند و در مواردی که تشابه انگلی وجود، دارد مانند

[۱*] استادیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد E-mail: Saeedhashemi2000@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استادیار گروه زراعت، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

www.SID.ir

Archive of SID

شباهت مرفولوژیکی *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا لستوکاردی*، با این روش‌ها نمی‌توان گونه‌های انگل را از هم تفکیک کرد (Kirvar et al. 1998). در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی نظیر PCR برای تشخیص تک‌یاخته‌ها در کنه‌های ناقل به کار گرفته شده است؛ زیرا از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روش‌های سنتی برخوردارند (Aktas et al. 2006). گرچه مطالعات اندکی در این زمینه در ایران صورت گرفته، با این حال در استان‌های شمالی و شرق ایران، بررسی‌های مشابهی در زمینه‌ی تیلریوز گوسفند انجام شده است (Heidarpour Bami et al. 2010, Tavassoli et al. 2011)؛ اما از آن جا که در غرب ایران، شناسایی کنه‌هایی که در انتقال *تیلریا* مؤثرند با استفاده از روش‌های ملکولی صورت نگرفته، لذا انگیزه‌ی اصلی پژوهش حاضر شده است.

مواد و روش کار

منطقه‌ی مورد مطالعه

در استان لرستان از گوسفندان خرم‌آباد (زاغه)، بروجرد (عربان)، دورود (میدانک و عزیزآباد)، الیگودرز (آبشار سفید) وپلدختر (چم مورت) (تصویر ۱) نمونه‌هایی از کنه‌های سطح بدن جمع‌آوری شده است.

تصویر ۱: مناطق مورد مطالعه در استان لرستان (www.ostan-lr.ir)

وضعیت آب و هوای منطقه‌ی تحت مطالعه

لرستان، دارای آب و هوای متنوعی است؛ به طوری که نواحی شمال و جنوب آن از نظر دما، میزان بارندگی سالیانه و رطوبت نسبی، متفاوت هستند؛ لذا در جدول ۱ میانگین دما، بارندگی و رطوبت نسبی طی ده سال اخیر در لرستان، نمایش داده شده است.

جدول ۱: نتایج بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی

منطقه‌ی نمونه‌گیری	تعداد نمونه	تعداد لام آلوده به تیلریا	میزان آلودگی (درصد)
الیگودرز (آبشارسفید)	۴۶	۷	۱۵/۲۱
دورود (میدانک و عزیزآباد)	۳۴	۴	۱۱/۷۶
بروجرد (عربان)	۲۳	۲	۸/۶۹
خرم آباد (زاغه)	۲۶	۳	۱۱/۵۳
پلدختر (چم مورت)	۲۱	۳	۱۴/۲۸
جمع کل	۱۵۰	۱۹	۱۲/۶۶

جمع‌آوری کنه‌ها و گسترش خونی

در مطالعه‌ی حاضر، از فروردین تا مرداد ماه ۱۳۹۱ از تعداد ۱۵۰ رأس گوسفند با سابقه‌ی تب و کم‌خونی، مجموعاً ۲۱۹ نمونه کنه از قسمت‌های زیر دنبه، گوش و کشاله‌ی ران و هم‌زمان از خون ورید گوش آن‌ها نمونه‌برداری و گسترش‌های نازک خونی تهیه گردید. گسترش‌های خون روی لام با متانول فیکس شد و با گیمسای ۵ درصد (pH=۷/۲) به مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و با میکروسکوپ نوری برای جستجوی اشکال

www.SID.ir

Archive of SID

پیروپلاسمی بررسی گشت. در بررسی حاضر، مشاهده‌ی اشکال پیروپلاسمی انگل در گسترش‌های خونی به منزله‌ی مثبت بودن آلودگی و عدم مشاهده‌ی آن در ۱۰۰ شان میکروسکوپی به منزله‌ی منفی بودن آلودگی، تلقی می‌گردید. نمونه‌های کنه در آزمایشگاه با کلید تشخیص استاندارد (Durrani et al. 2011, Hashemi-Fesharaki et al. 1997) تشخیص جنس و گونه شد. سپس هر کنه توسط قیچی و میکرو اسکالپل استریل از ناحیه‌ی اسکوتوم برش داده و غده‌ی بزاقی آن جدا شد و در میکروتیوب‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای مراحل استخراج DNA نگه‌داری گردید.

استخراج DNA از غدد بزاقی کنه‌ها

در تحقیق حاضر، غدد بزاقی تعداد ۱۵۲ کنه *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، ۱۳ کنه‌ی *ریپی سفالوس بورسا* و ۵۴ کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* جدا و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. عملیات استخراج با استفاده از کیت (DNA Extraction Kit, Cinagene, Iran) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. نمونه‌های DNA تا مراحل بعدی در دمای انجماد ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

روش PCR

در تحقیق حاضر، یک جفت پرایمر با توالی (TSsr170F;5'TCGAGACCTTCGGGT3',TSsr670R; 5'TCCGGACATTGTAAAACAAA-3') برای تکثیر یک قطعه‌ی ژنی با اندازه‌ی ۵۲۰ جفت باز متعلق به ژن ssurRNA ریبوزومی *تیلریا اویس* و یک جفت پرایمر با توالی (5'GTGCCGCAAGTGAGTCA3'5' GGACTGATGAGAAGACGATGAG3') برای تکثیر یک قطعه‌ی ژنی با اندازه‌ی ۷۸۵ جفت باز متعلق به ژن پروتئین سطحی مروزوئیت *تیلریا لستوکاردی*، بر اساس روش کار Durrani و همکاران در سال ۲۰۱۱ به کار گرفته شد.

ابتدا عملیات PCR روی کنترل مثبت، انجام گردید که با پرایمر پاسخ مناسبی در نمونه‌های مثبت دیده شد. کنترل مثبت *تیلریا لستوکاردی* با کشت سلولی نمونه‌ی حاصل از یک گوسفند آلوده، تهیه شد و کنترل مثبت *تیلریا اویس* از خون گوسفند آلوده جدا گردید. عملیات PCR روی نمونه‌های DNA کنه با استفاده از این پرایمرها انجام گرفت؛ البته واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر طراحی شده بود که شامل ۱ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر DNA نمونه، آنزیم polymerase DNA ۰/۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر پرایمر Reverse و ۲ میکرولیتر پرایمر Forward بود و سپس حجم نمونه با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده می‌شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها مطابق با برنامه، ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل : ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۲ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای *تیلریا اویس* و ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای *تیلریا لستوکاردی* در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند. در پایان محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. سپس ژل حاصل شده با اتیدیوم بروماید، رنگ‌آمیزی و در دستگاه ژل داک، تحت اشعه‌ی UV بررسی و عکس‌برداری انجام می‌گردید.

تعیین توالی ژن

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ۴ محصول PCR *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* به همراه ۱۰ میکرولیتر از پرایمرهای F و R برای خالص‌سازی و تعیین توالی ژن برای شرکت تکاپو زیست، ارسال شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

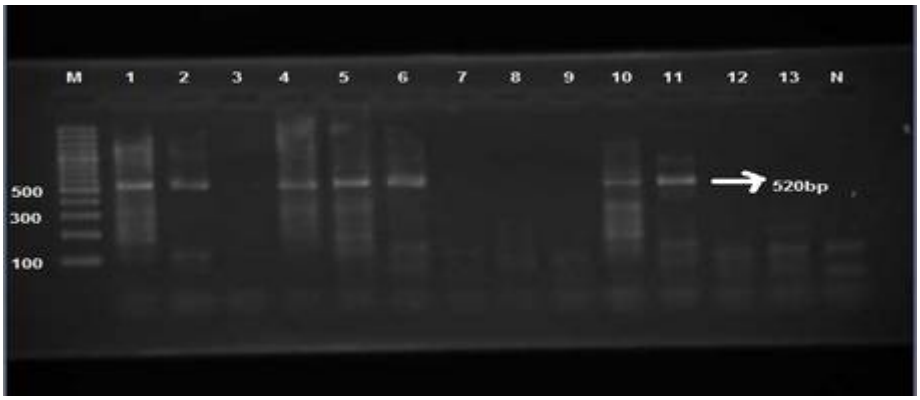
بررسی میکروسکوپی لام‌های خونی

در بررسی ۱۵۰ لام گسترش نازک با میکروسکوپ نوری، اشکال پیروپلاسمی موجود در گلبول‌های قرمز در ۱۹ نمونه (۱۲/۶۶ درصد) مشاهده گردید که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان آلودگی به ترتیب در الیگودرز و بروجرد بوده است ($P<۰/۰۵$).

یافته‌های PCR

در آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی *تیلریا اویس*، از ۱۵۲ کنه‌ی *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، تعداد ۳۷ کنه (۲۴/۳۴ درصد) شامل ۲۱ کنه‌ی ماده (۱۳/۸۱ درصد) و ۱۶ کنه‌ی نر (۱۰/۵۲ درصد)، قطعه‌ی ژنی با اندازه‌ی ۵۲۰ جفت باز، متعلق به ژن ریبوزومی *تیلریا اویس* را در غدد بزاقی خود نشان دادند؛ اما در کنه‌های *ریپی سفالوس بورسا* نتایج منفی بود و ژنوم این انگل یافت نشد (تصویر ۲).

در بین کنه‌های آلوده، بیش‌ترین میزان آلودگی در الیگودرز ۱۶ مورد (۳۲/۶۵ درصد) و کم‌ترین میزان در بروجرد ۳ مورد (۱۸/۷۵ درصد) مشاهده گردید (جدول ۲).



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR جهت جستجوی ژن اختصاصی *تیلریا اویس* در کنه‌های *ریپی سفالوس*: ستون M مارکر 100bp، ستون ۱ کنترل مثبت *تیلریا اویس* با اندازه‌ی ۵۲۰ جفت باز، ستون‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ کنه‌ی *ریپی سفالوس سانگوئینوس* ماده و ستون‌های ۱۰ و ۱۱ *ریپی سفالوس سانگوئینوس* نر و ستون N کنترل منفی است.

جدول ۲: میزان آلودگی گوسفندان لرستان به کنه‌های جنس *ریپی سفالوس* به *تیلریا اویس* با روش PCR

منطقه‌ی تحت مطالعه	*ریپی سفالوس سانگوئینوس*				*ریپی سفالوس بورسا*		
	تعداد کنه آزمایش شده	تعداد کنه‌های آلوده و (٪)	آلودگی کنه‌های ماده (٪)	آلودگی کنه‌های نر (٪)	تعداد آزمایش شده	آلودگی کنه‌های ماده (٪)	آلودگی کنه‌های نر (٪)
الیگودرز (آیشار سفید)	۴۹	۱۶ (۳۲/۶۵)	۲۰/۴۰	۱۲/۲۴	۱۰	۰	۰
دورود (میدانک و عزیزآباد)	۳۲	۷ (۲۱/۸۷)	۹/۳۷	۱۲/۵۰	۳	۰	۰
بروجرد (عربان)	۱۶	۳ (۱۸/۷۵)	۱۲/۵۰	۶/۲۵	۰	۰	۰
خرم آباد (زاغه)	۳۶	۷ (۱۹/۴۴)	۱۱/۱۱	۸/۳۳	۰	۰	۰
پلدختر (چم مورت)	۱۹	۴ (۲۱/۰۴)	۱۰/۵۲	۱۰/۵۲	۰	۰	۰
جمع	۱۵۲	۳۷ (۲۴/۳۴)	۲۳/۰۷	۲۶/۲۲	۱۳		۰

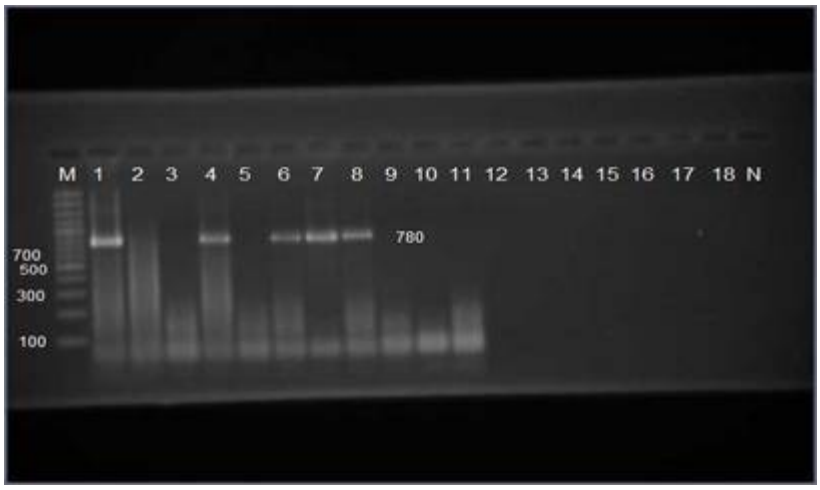
www.SID.ir

Archive of SID

غده‌ی بزاقی ۵۳ کنه *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* با استفاده از پرایمر اختصاصی نیز مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۵ نمونه (۹/۲۵ درصد) شامل غدد بزاقی ۳ کنه‌ی ماده (۵/۵۵ درصد) و ۲ کنه‌ی نر (۳/۷۰ درصد) واجد ژنوم *تیلریا لستوکاردی* بودند (تصویر ۳) که این کنه‌های آلوده از آبشار سفید الیگودرز جمع‌آوری شده بودند (جدول ۳).

جدول ۳: میزان آلودگی کنه‌های جنس *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* **به** *تیلریا لستوکاردی* **با روش PCR در گوسفندان لرستان**

محل نمونه‌گیری	تعداد کنه‌های آزمایش شده	تعداد کنه‌ی آلوده به *تیلریا لستوکاردی*		میانگین آلودگی برحسب جنس کنه (٪)		میانگین آلودگی برحسب منطقه (٪)
		کنه‌ی ماده	کنه‌ی نر	کنه‌ی ماده (٪)	کنه‌ی نر (٪)	
الیگورز (آبشارسفید)	۳۶	۳	۲	۵/۵۵	۳/۷۰	۱۳/۸۸
خرم آباد (زاغه)	۱۸	–	–	–	–	–



تصویر ۳: تصویر الکتروفورز محصول PCR جستجوی ژن اختصاصی *تیلریا لستوکاردی* **در کنه‌های** *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم*: **ستون M مارکر 100 bp، ستون ۱ کنترل مثبت با اندازه‌ی ۷۸۵ جفت باز، ستون ۴ کنه‌ی نر آلوده و ستون‌های ۶، ۷، ۸ کنه‌ی ماده‌ی آلوده، ستون N کنترل منفی**

نتایج تعیین توالی ژن، با نرم‌افزار BLAST بررسی گردید و مشخص شد که ژن *تیلریا اویس* موجود در لرستان با ژن M56 جدا شده در مازندران (GU726904)، شباهت کاملی دارد (Zaeemi et al. 2011). مقایسه‌ی نوکلئوتیدهای ژن *تیلریا لستوکاردی* در بررسی حاضر با دیگر ژن‌های موجود در بانک ژن ایران، تشابه ۹۵/۶–۹۲/۷ درصدی را نشان داد؛ به علاوه، ژن‌های به دست آمده در بررسی حاضر با شماره‌های KC599235 و KC599236 به ترتیب برای *تیلریا لستوکاردی* و *تیلریا اویس* در بانک ژن، ثبت گردید.

بحث

تیلریوز یک بیماری انگلی منتقل شونده توسط کنه‌های سخت در نشخوارکنندگان کوچک ایران و منطقه‌ی لرستان در فصول گرماست.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی کنه‌های ناقل *تیلریا* و میزان شیوع و پراکندگی آن‌ها در تعیین اپیدمیولوژی *تیلریوز*، بسیار حیاتی است (Alani and Herbert 1988, Rahbari et al. 2007). در لرستان به سبب تفاوت آب و هوا در مناطق مختلف آن، میزان شیوع و پراکندگی کنه‌های سخت، متفاوت شده است؛ به عنوان مثال در مناطق مرکزی و جنوبی استان که دمای محیط بیش‌تر و میزان بارندگی تا حدودی نسبت به سایر نقاط کم‌تر است، *ریپی سفالوس بورسا* یافت نشده؛ در حالی که در نقاط دارای آب و هوای معتدل‌تر، نمونه‌هایی از آن جمع‌آوری شده است (جدول ۲). شایان ذکر است که تا کنون مطالعه‌ی قابل توجهی در مورد با ناقل بودن این کنه‌ها در استان مذکور، انجام نشده است.

تشخیص انگل در میزبان ناقل با روش‌های سنتی، مشکل است (Sparagano et al. 2004)؛ لذا امروزه با روش‌های مولکولی، گونه‌ی انگل را هم می‌توان مشخص کرد. در بررسی حاضر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مشخص شد که کنه‌های ریپی *سفالوس سانگوئینوس* و *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* (Hoogstraal and Wassef 1985) قادرند به ترتیب *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* را از طریق غدد بزاقی، به گوسفند و بز منتقل کنند (تصویر ۲). در یک بررسی در شرق مازندران، *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، مهم‌ترین ناقل *تیلریا اویس* در گوسفندان آن ناحیه بوده و میزان آلودگی این کنه، ۵۵ درصد گزارش شده است (Telmadarraiy et al. 2012) گرچه در مقایسه با مطالعه‌ی حاضر، محققان مزبور، تعداد کمی نمونه را بررسی کردند؛ ولی با این حال، نتایج مشابهی به دست آمده است. Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۳ با رنگ‌آمیزی غدد بزاقی کنه *ریپی سفالوس سانگوئینوس* و *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* با روش فولگن، میزان آلودگی این کنه‌ها به *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* را به ترتیب ۴ درصد و ۱۵ درصد گزارش کردند؛ در حالی که در مطالعه‌ی حاضر با تکنیک PCR میزان آلودگی، بیش از ۲۴ درصد بوده است؛ لذا روش مولکولی بیش‌ترین حساسیت را در تشخیص و تفکیک گونه‌های *تیلریا* دارد. در جنوب استان خراسان با روش PCR گوسفندان منطقه از نظر آلودگی به گونه‌های *تیلریا*، بررسی و میزان آلودگی ۱۱/۹ درصد گزارش شده است. هم‌چنین مشخص شد که بیش از نیمی از کنه‌های *ریپی سفالوس سانگوئینوس* به گونه‌های *تیلریا* آلوده بوده‌اند (Razmi et al. 2006).

Heidarpour Bami و همکاران در سال ۲۰۱۰ با روش PCR-RFLP میزان شیوع *تیلریوز* در گوسفندان را ۲۲/۲۷ درصد گزارش کردند. در بررسی فعلی، گسترش‌های خونی فقط با میکروسکوپ نوری بررسی شد؛ بدین دلیل، میزان آلودگی در مقایسه با گزارش محققان مزبور، کم‌تر می‌باشد. Shayan و همکاران در سال ۲۰۰۷ گونه‌های *ریپی سفالوس سانگوئینوس* و *ریپی سفالوس بورسا* را ناقل *بابزیا اویس* معرفی نمودند. Abdigoudarzi در سال ۲۰۱۳ با روشی مشابه بررسی حاضر، ولی با پرایمرهای اختصاصی دیگر، نشان داد که کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* جمع‌آوری شده از فارس و کنه‌ی *هیالوما دتریتوم* (*H. detritum*) از آب باریک الیگودرز، ناقل *تیلریا لستوکاردی* هستند. به هر حال در ایران، مطالعه روی کنه‌ها کم‌تر صورت گرفته و بررسی‌ها بیش‌تر روی نمونه‌های خون دام، انجام و کم‌تر به کنه‌های ناقل توجه شده است . Altay و همکاران در سال ۲۰۰۵ با پرایمرهای مشابه تحقیق حاضر، تیلریوز تحت کلینیکی را درشرق ترکیه ۵۰/۰۳ درصد گزارش کرده‌اند. در پاکستان Durrani و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بررسی تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی کنه با پرایمرهای مشابه بررسی حاضر، نشان دادند که ۶۵/۸ درصد کنه‌های *ریپی سفالوس سانگوئینوس*، ناقل *تیلریا اویس* و ۶۶/۶ درصد کنه‌های *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* ناقل *تیلریا لستوکاردی* می‌باشند. گرچه میزان آلودگی کنه‌های مذکور در پاکستان نسبت به مطالعه‌ی حاضر بیش‌تر است، ولی روش کار، مشابه این بررسی بوده است. در شرق ترکیه، حضور این انگل در کنه‌ی *ریپی سفالوس بورسا* ۱۹/۲۷ درصد گزارش شده است (Aktas et al. 2006)؛ در حالی که تعداد کنه‌ی *ریپی*

www.SID.ir

Archive of SID

سفالوس بورسا در بررسی حاضر بسیار اندک بود و فاقد انگل نشان داده شد؛ لذا به نظر می‌رسد میزان شیوع گونه‌ی *ریپی سفالوس بورسا* در شرق ترکیه نسبت به لرستان، بیش‌تر است و این ممکن است به دلیل اختلاف شرایط اقلیمی باشد.

به هر حال در اکثر مطالعات انجام شده، کنه‌ی *ریپی سفالوس سانگوئینوس* به عنوان ناقل اصلی تیلریوز تحت حاد و *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم* به عنوان ناقل اصلی تیلریوز حاد در نقاط مختلف ایران و خاورمیانه، معرفی شده که با تحقیق حاضر، هم‌خوانی دارد؛ ولی میزان فراوانی این کنه‌ها در دام‌های کوچک و میزان آلوده بودن آن‌ها به گونه‌های *تیلریا* در بخش‌های مختلف لرستان، ایران و کشورهای مجاور، متفاوت است که ممکن است ناشی از اختلاف دما و میزان بارندگی سالانه باشد. ولی از آن جا که منطقه‌ی الیگودرز نسبت به نواحی جنوب و شرق لرستان، میزان بارندگی و رطوبت نسبی بالاتر و دمای معتدل‌تری دارد، مستعد تیلریوز حاد گوسفند می‌باشد؛ لذا نتایج مطالعه‌ی حاضر، وجود کنه‌ی ناقل آن را در این منطقه، تایید می‌کند که با نتایج مطالعات مشابه در کشور، هم‌خوانی دارد؛ در حالی که *ریپی سفالوس سانگوئینوس* در اکثر نقاط این استان با نسبت‌های مختلفی دیده شده که ناقل اصلی *تیلریا اویس*، شناخته شده است.

منابع

Abdigoudarzi, M. (2013). Detection of naturally infected vector ticks (Acari: Ixodidae) by different species of *Babesia* and *Theileria* agents from three different enzootic parts of Iran. Journal of Arthropod -Borne Disease, 7(2): 164-172.

Aktas, M.; Altay, K. and Dumanli, N. (2006). PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. Veterinary Parasitology, 140: 259-263.

Alani, A.J. and Herbert, I.V. (1988). Pathogenesis of Infection with *Theileria recondita* isolated from *Haemaphysalis punctate* from northWales. Veterinary Parasitology, 4 : 293-301.

Altay, K.; Dumanli, N.; Holman, P.J. and Aktas, M. (2005). Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. Veterinary Parasitology, 127: 99-104.

Durrani, A.Z.; Younus, M.; Kamal, N.; Mehmood, N. and Shakoori, A.R. (2011). Prevalence of ovine *Theileria* species in District Lahore. Pakistan Journal of Zoology, 43(1): 57-60.

Estrada-Pena, A.; Bouattour, A.; Cam-icas, J.L. and Walker, A.R. (2004). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species, 1st ed. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; Pp: 43-131.

Hashemi-Fesharaki, R. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parassitologia, 39: 115-117.

HeidarpourBami, M.; Khazraiinia, P.; Haddadzadeh, H. and Kazemi, B. (2010). Identification of Theileria species in sheep in the eastern half of Iran using nested PCR-RFLP and microscopic techniques. Iranian Journal of Veterinary Research, 11(3): 262-266.

Hoogstraal, H.; Wassef, Y.H. and Gallagher, M.D. (1985). *Hyalmoma anatolicum* and Indian Pakistani cattle tick parasitizing bovine in Oman. Veterinary Parasitology, 71(1): 129-130.

Kirvar, E.; Ilhan, T.; Katzer, F.; Wilkie, G.; Hooshmand-Rad, P. and Brown, C.G.D. (1998). Detection of *Theileria lestoquardi (hirci)* in ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. Annals of the New York Academy of Sciences, 894: 52-62.

Rahbari, S.; Nabian, S. and Shayan, P. (2007). Primary report on distribution of tick fauna in Iran. Parasitology Research, 101(2): 175-177.

Razmi, G.R.; Eshrati, H. and Rashtibaf, M. (2006). Prevalence of Theileria spp infection in sheep in South Khorasan province, Iran. Veterinary Parasitology, 140(3-4): 239-243.

Razmi, G.R.; Hosseini, M. and Aslani, M.R. (2003). Identification of tick vectors of ovine theileriosis in an endemic region of Iran. Veterinary Parasitology, 116: 1- 6.

Shayan, P.; Hooshmand, E.; Rahbari, S. and Nabian, S. (2007). Detection of *Rhipicephalus spp* as vectors of *Babesia ovis* in Iran. Parasitology Research, 101: 1029-1033.

Sparagano, O.; Spitalska, E.; Namavari, M.M.; Hosseini, M.H.; Shad-del, F.; Seghatoleslam, A. and Amabadi, O.R. (2004). Screening tick-borne diseases in sheep. Epi-demiol. et Santé Animale, 45: 73-75.

www.SID.ir

Archive of SID

First molecular detection of *Theileria ovis* in Rhipicephalus sanguineus tick in Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4: 29-32.

Zaeemi, M.; Haddadzadeh, H.R.; Khazrainia, P.; Kazemi, B. and Bandehpour, M. (2011). Identification of different *Theileria* species (*T.lestoquardi*, *T.ovis* and *T.anuulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. Parasitology Research,108(4): 837-843.

Tavassoli, M.; Tabatabaei, M.; Esmaeil Nejad, B.; Tabatabaei, M.H.; Najafabadi, A. and Pourseyed, S.H. (2011). Detection of *Theileria annulata* by the PCR-RFLP in ticks (Acari,Ixodidae) collected from cattle in West and North-West Iran. Acta Parasitologica, 56(1): 8-13.

Telmadarraiy, Z.; Oshaghi, M.A.; Hosseini Vasoukolaei, N.; Yaghoobiershadi, M.R.; Babamahmoudi, F. and Mohtarami, F. (2012).

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 11, No. 3, Autumn, 2015

Molecular identification of *Theileria ovis* and *T. lestoquardi* in vector ticks of Ixodidae family in Lorestan province

Hashemi, S.[1] and Estaki oregani, Kh[2]

Received: 21.07.2014 Accepted: 28.02.2015

Abstract

Theileriosis is caused by an intracellular protozoan parasite of *Theileria* species, which is transmitted by Ixodidae ticks. Recognition of the vector ticks is essential in each area for establishing some integrated preventive measures against the disease. Therefore, 219 ticks were collected from the body surface of 150 sheep suffering from fever and anemia, in different parts of the province, during April - August 2012. Also, thin blood films were prepared from the peripheral blood of these animals. DNA of the tick salivary glands including 152 *Rhipicephalus sanguineus*, 13 *R. bursa* and 54 *Hyalomma anatolicum anatolicum* were extracted. Then PCR, using a pair of 520 bp specific primer of SSurRNA gene of *Theileria ovis*, as well as a pair of specific primer for amplification of 785bp of *T. lestoquardi* merozoite surface antigens, was performed. The PCR revealed that 37 out of 152 *R. sanguineus* (24.34 %) were positive for *Theileria ovis*, whereas none of *R. bursa* ticks were positive. Also, 5 out of 54 *H. a anatolicum* (9.25 %) were positive for *T. lestoquardi*. The microscopic examinations of blood smears showed that 19 out of 150 blood smears (12.66 %) contained the piroplasmic forms of *Theileria* species. Regarding the vast distribution of *R. sanguineus* in the area, it seems that this tick may be the main vector of *Theileria ovis* in Lorestan province, Iran.

Key words: Ixodidae, *Theileria ovis*, *Theileria lestoquardi*, Lorestan, Iran

1- Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Agricuture, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agricuture, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Iran

Corresponding Author: Hashemi, S., E-mail: Saeedhashemi2000@yahoo.com

www.SID.ir