Archive of SID

شناسایی مولکولی گونه‌های تیلریا اویس و تیلریا لستوکاردی در نشخوارکنندگان کوچک استان آذربایجان‌شرقی طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴

- **عباس ایمانی‌باران***: گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- **هادی یوسفی‌تبریزی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- **مهدی بساکی**: گروه علوم پایه، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- **حمید اکبری**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- **احد بازمانی**: مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

گونه‌های تیلریا انگل‌های تک یاخته‌ای خونی داخل سلولی اجباری هستند که توسط گونه‌های مختلف کنه‌های سخت منتقل شده و باعث تیلریوزیس می‌شوند. به‌لحاظ جغرافیایی، این بیماری دارای پراکندگی جهانی بوده و اکثراً در نواحی گرمسیر و نیمه‌گرمسیر دیده می‌شود. در ایران، آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک توسط گونه‌های تیلریا اویس و تیلریا لستوکاردی ایجاد می‌شود. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های تیلریا اویس و تیلریا لستوکاردی در نشخوارکنندگان کوچک استان آذربایجان‌شرقی صورت گرفت. برای این منظور، مجموعاً ۱۶۶ نمونهٔ خون (۱۲۵ رأس گوسفند و ۴۱ رأس بز) از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شدند و بررسی‌های مولکولی و میکروسکوپی روی آن‌ها انجام گرفتند. در نتایج مولکولی، ۱۸درصد نمونه‌ها صرفاً آلوده با تیلریا اویس بودند، ولی در بررسی میکروسکوپی آلودگی مشاهده نشد. آلودگی فقط مربوط به نمونه‌های گوسفند بود. از نظر آماری اختلافی بین آلودگی و سن و جنس مشاهده نشد ($p>0/05$). مقایسهٔ توالی‌های محصولات PCR با توالی‌های مربوط به SSU rRNA موجود در بانک ژن نشان داد که توالی قطعات تکثیر شده در مطالعهٔ حاضر ۱۰۰-۹۸ درصد با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن یکسان می‌باشند. بررسی فیلوژنی نشان داد که توالی به‌دست آمده در مطالعه حاضر با بسیاری از توالی‌های به‌دست آمده از نقاط مختلف دنیا در سال‌های مختلف در یک مجموعه قرار گرفته و ارتباط نزدیکی با این توالی‌ها دارد. براساس یافته‌ها می‌توان گفت آلودگی تیلریایی به شکل تحت بالینی در بین نشخواکنندگان کوچک استان آذربایجان‌شرقی وجود داشته و تیلریا اویس عامل اصلی آلودگی تیلریایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: تیلریا اویس، تیلریا لستوکاردی، نشخوارکنندگان کوچک، شناسایی مولکولی، آذربایجان‌شرقی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: a.imani@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کنه‌ها و بیماری‌های منتقله به‌وسیله آن‌ها موانع مهمی برای پیشرفت صنعت دامپروری و تجارت بین‌المللی دام‌ها محسوب می‌شوند (Inci و همکاران، ۲۰۱۰). بیماری‌های حاصل از کنه به سبب مرگ دام‌های مبتلا، کاهش فعالیت تولیدمثلی، وخامت شرایط بهداشت و سلامت دام و تحمیل هزینه‌های بالا برای کنترل چنین بیماری‌هایی خسارات جبران‌ناپذیر اقتصادی را موجب می‌شوند (Riaz و همکاران، ۲۰۱۷). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی انتقال یافته با کنه، بیماری تک‌یاختهٔ خونی تیلریوزیس (Theileriosis) است که توسط گونه‌های تیلریا (*Theileria* spp) در مهره‌داران خونگرم، عمدتاً پستانداران اهلی و وحشی، ایجاد می‌شود. تیلریا یک جنس مهم از تک یاختگان متعلق به شاخهٔ آپی کمپلکسا، ردهٔ پیروپلاسمیدا، راستهٔ اسپوروزوآ و خانوادهٔ تیلری‌ئیده است که توسط کنه‌های سخت خانوادهٔ ایکسودیده، به‌عنوان ناقلین طبیعی انتقال می‌یابد (Soosaraei و همکاران، ۲۰۱۸). در نشخوارکنندگان کوچک تیلریوزیس حداقل به‌واسطهٔ شش گونهٔ مختلف تیلریا ایجاد می‌شود. سه گونهٔ تیلریا لستوکاردی (*T. lestoquardi*)، تیلریا لوونشونی (*T. luwenshuni*)، تیلریا یوئیلنبرگی (*T. uilenbergi*) گونه‌های فوق‌العاده بیماری‌زا و عامل اصلی مرگ و میر بالا هستند، درحالی‌که گونه‌های تیلریا سپاراتا (*T. separata*)، تیلریا اویس (*T. ovis*) و تیلریا رکونديتا (*T. recondita*) کم‌تر بیماری‌زا بوده و بیماری ملایم‌تر یا تحت بالینی را باعث می‌شوند. تیلریا لستوکاردی عامل اصلی تیلریوزیس بدخیم گوسفندی در شبه قارهٔ هند، غرب آسیا و حوزهٔ مدیترانه است (Riaz و Tarawar، ۲۰۱۷). به‌لحاظ جغرافیائی، تیلریوزیس نشخوارکنندگان کوچک به‌طور وسیع در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا که گوسفند و بز پرورش داده می‌شوند، گسترش دارد (Altay و همکاران، ۲۰۰۷). در سیستم کشاورزی آسیایی، نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) یک نقش اساسی در محیط‌های خاص اکولوژیکی ایفاء می‌کنند و از این لحاظ این دام‌ها از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار هستند (Irshad و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه گوسفند و بز بخش عمده‌ای از تجارت بین‌المللی و فرآورده‌های دامی هستند، ولی تیلریوزیس نشخوارکنندگان کوچک کم‌تر مطالعه شده است (Razmi و همکاران، ۲۰۰۶). براساس یافته‌های مطالعات در ایران، دو گونهٔ اصلی تیلریا اویس و تیلریا لستوکاردی (هیرسی)، عوامل اصلی آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک ایران هستند. اگر چه میزان آلودگی با دو گونهٔ تیلریا در مناطق مختلف ایران با درصدهای متفاوت گزارش شده است، ولی جنبه‌های اپیدمیولوژیکی تیلریوزیس نشخوارکنندگان کوچک در ایران به‌طور کامل شناخته نشده است و بررسی‌های بیش‌تری در این راستا لازم است تا توسعهٔ معیارهای کنترلی علیه این بیماری منتقله از کنه تسهیل شود (Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۰۹؛ Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zaeemi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Rashdi و Razmi، ۲۰۱۳؛ Jalali و همکاران، ۲۰۱۴). معمولاً تشخیص آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک براساس آزمایش میکروسکوپی گسترش‌های خونی نازک رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا و مشاهدات علائم بالینی صورت می‌گیرد، ولی این روش‌ها صرفاً در تشخیص موارد حاد بیماری کاربردی هستند و برای تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف، به‌ویژه در عفونت‌های مختلط، با توجه به شباهت مورفولوژیکی انگل‌های مختلف در میزبان‌های مشابه و چهره‌های مختلف میکروسکوپیکی یک انگل در میزبان‌های مختلف چندان قابل اعتماد نیستند. در برخی موارد دام‌های بهبود یافته برای همیشه عفونت‌های تحت بالینی را در خود حفظ می‌کنند که در بررسی‌های میکروسکوپیکی غیرقابل تشخیص خواهند بود. بنابراین این دام‌ها می‌توانند به‌عنوان مخزن آلودگی برای ناقلین بالقوه در انتقال طبیعی آلودگی محسوب شوند. تست‌های سرولوژیکی که به‌طور فراوان در تعیین عفونت‌های تحت بالینی به‌کار گرفته می‌شوند، معمولاً با نتایج مثبت و منفی کاذب زیادی به‌دلیل واکنش‌های متقاطع و یا ضعف در پاسخ ایمنی اختصاصی همراه هستند و برای تشخیص حامل، خصوصاً برای تعیین وضعیت بیماری، فاقد حساسیت و ویژگی هستند. به‌علت برخی مشکلات همراه با روش‌های مرسوم برای تشخیص عوامل آلودگی تیلریایی نشخوارکنندگان کوچک، روش‌های جدید و متنوع مولکولی براساس تکثیر قسمت‌های اختصاصی DNA ابداع شده‌اند که از حساسیت و ویژگی بیش‌تری نسبت به سایر روش‌های مرسوم برخوردار بوده و امکان تشخیص آلودگی تیلریایی حتی در میزان پایین پارازیتمی و نیز تفریق گونه‌های مختلف تیلریا را فراهم می‌سازد (Jalali و همکاران، ۲۰۱۴؛ Aktas و همکاران، ۲۰۰۵؛ Altay و همکاران، ۲۰۰۵؛ Durrani و همکاران، ۲۰۱۱). برای به‌دست آوردن اطلاعات دقیق از تنوع‌زیستی موجودات، لازم است توالی‌هایی از یک ناحیه ژنی به اندازه کافی متغیر به‌دست آید. یک مارکر رایج، تحت واحد کوچک ژن RNA ریبوزومی (SSR rRNA) است که توالی و ساختار آن مشخص شده است و شامل نه ناحیهٔ بسیار متغیر (V1 تا V9) است. اگرچه SSR rRNA در تمام سلول‌های زنده با عملکرد بسیار حفاظت‌شده، وجود دارد، ولی تفاوت‌های مشخصی بین توالی‌های آن در یوکاریوت‌ها در مقایسه با پروکاریوت‌ها وجود دارد. از آن‌جایی‌که ناحیهٔ V6 متغیر و مناسب برای مطالعات تنوع‌زیستی پروکاریوت‌ها درنظر گرفته شده است، این ناحیه در یوکاریوت‌ها خیلی محافظت شده است. از سوی دیگر، ناحیهٔ V4 متغیرترین ناحیه در یوکاریوت‌هاست، درحالی‌که در پروکاریوت‌ها کوتاه‌تراست. برای مطالعات تنوع زیستی موجودات یوکاریوتی، چندین ناحیهٔ متغیر پیشنهاد شده است، که از آن‌ها V4 و V9

www.SID.ir

Archive of SID

برجسته‌ترین نواحی هستند (Hadziavdic و همکاران، ۲۰۱۴). اخیراً نشان داده شده است که ۱۸S rRNA یک مارکر خوب برای حل روابط فیلوژنی در موجودات متنوع از جمله انگل‌هاست (Foronda و همکاران، ۲۰۰۴). اگر چه گونه‌های تیلریا در دام‌های ایران گزارش شده‌اند ولی میزان شیوع و فراوانی آلودگی گونه‌های این تک‌یاختهٔ مهم خونی در برخی مناطق ایران، ازجمله استان آذربایجان‌شرقی، تعیین نشده است. به‌دلیل فقدان اطلاعات در ارتباط با شناسائی مولکولی گونه‌های تیلریا اوویس و تیلریا لستوکاردی و فراوانی آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک استان آذربایجان‌شرقی، مطالعهٔ حاضر به‌منظور شناسائی عوامل و تعیین فراوانی مولکولی آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: برای نمونه‌برداری، از تیر ماه سال ۱۳۹۴ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۵، نمونه‌های خون از ۱۶۶ رأس دام سالم (۱۲۵ رأس گوسفند و ۴۱ رأس بز) به‌طور تصادفی از چند گله واقع در شهرستان‌های مختلف استان آذربایجان‌شرقی (جلفا، کلیبر، مرند، تبریز، ورزقان، آذرشهر، مراغه و هشترود) جمع‌آوری شدند، لازم به ذکر است که در حین نمونه‌برداری هیچ کنه‌ای روی دام‌ها مشاهده نشد. از هر حیوان دو سی‌سی خون از ورید وداج با استفاده از لولهٔ ونوجکت حاوی مادهٔ ضدانعقاد ($EDTA\text{-}K_2$) اخذ شد. هم‌چنین، گسترش‌های نازک خون برای ارزیابی میکروسکوپی آلودگی در حین نمونه‌برداری تهیه شدند. نهایتاً، نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در کنار یخ قرار داده شدند و هم‌زمان اطلاعات لازم از قبیل اسامی مناطق نمونه‌برداری، موقعیت جغرافیائی مناطق، نوع دام، سن دام، جنس دام و زمان نمونه‌برداری روی بر چسب لولهٔ شماره‌گذاری و در دفتر ثبت اطلاعات یادداشت شدند (جدول ۱). سپس نمونه‌ها تحت شرایط انجماد در کم‌ترین بازهٔ زمانی به مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز منتقل و تا انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

آزمایش میکروسکوپی: پس از خشک‌شدن نمونه‌های گسترش خون تهیه شده در مرحلهٔ نمونه‌برداری، با متانول مطلق تثبیت و پس از رنگ‌آمیزی با محلول ۵٪ درصد گیمسا به‌مدت ۲۰ دقیقه، برای اثبات وجود آلودگی تیلریایی حداقل ۲۰۰ میدان میکروسکوپی در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰x به‌دقت بررسی شدند (Jalali و همکاران، ۲۰۱۴).

استخراج DNA: با استفاده از یک کیت تجاری استخراج DNA ژنومی (PAK Gene Yakhteh, Cat No. PGEX2050) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازندهٔ کیت، DNA از تمام نمونه‌های خون استخراج شدند.

جدول ۱: مشخصات گونه، جنس و سن دام‌های نمونه برداری شده

نوع دام	تعداد کل	سن دام (سال)		جنس دام	
		≥۲	<۲	ماده	نر
گوسفند	۱۲۵	۸۸	۳۷	۱۰۹	۱۶
بز	۴۱	۳۹	۲	۴۰	۱
مجموع	۱۶۶	۱۲۷	۳۹	۱۴۹	۱۷

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای تشخیص آلودگی احتمالی به گونهٔ تیلریا لستوکاردی، قطعه‌ای به طول ۷۸۵ جفت باز مربوط به ژن کدکنندهٔ آنتی‌ژن ۳۰ کیلودالتونی سطح مروزوئیت تیلریا لستوکاردی (MSP) با جفت پرایمرهای اختصاصی گونه (جدول ۲) تکثیر شد (Aktas و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین، برای تشخیص آلودگی احتمالی به گونه تیلریا اویس، به‌طور جداگانه، قطعهٔ کاملاً اختصاصی به‌طول ۳۹۸ جفت بازی مربوط به ژن SSU rRNA (Gen Bank: AY508453.1NCBI) گونهٔ تیلریا اویس با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه (جدول ۲) تکثیر شد (Altay و همکاران، ۲۰۰۵). در هر دو مرحلهٔ PCR، هر واکنش PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از DNA نمونه‌ها، ۱۰ پیکوگرم از هر پرایمر و بقیه از مستر میکس (Bioneer Inc., Korea) بود. برنامهٔ زمانی-دمایی برای هر دو واکنش در دستگاه ترمال سایکلر عبارت بود از: واسرشت اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل، واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه و گسترش نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه. نهایتاً، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر نمونه با انتقال روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردیده و با استفاده از دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد. لازم به‌ذکر است در این مطالعه فقط از نمونهٔ دارای تیلریا اویس نگه‌داری شده در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و گونهٔ تیلریا لستوکاردی به‌عنوان کنترل مثبت در دسترس نبود. هم‌چنین، از مواد PCR، بدون نمونهٔ DNA، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی توالی: برای تعیین توالی قطعات ۳۹۸ جفت بازی مربوط به تیلریا اویس واکنش‌های PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. توالی محصولات PCR مربوط به پنج نمونهٔ مثبت به‌طور جداگانه و در دو جهت مستقیم و معکوس توسط شرکت پویا گسترش ژن تعیین شد. برای تأیید یکسانی توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود

www.SID.ir

Archive of SID

در بانک ژن از برنامهٔ نرم‌افزاری nBLAST NCBI استفاده شد. برای هم‌تراز کردن توالی‌ها از نرم‌افزار Clustal ω و برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار Mega4و روش اتصال همسایه (Neighbor joining) استفاده شد. از توالی ژن ۱۶S rRNA مربوط به آناپلاسما اویس به‌عنوان Out group استفاده شد.

جدول ۲: توالی‌ها و مشخصات پرایمرهای اختصاصی تیلریا لستوکاردی و تیلریا اویس

گونهٔ تیلریا	نام پرایمر	۵'-۳'
T. lestoquardi	F	GTGCCGCAAGTGAGTCA
	R	GGACTGATGAGAAGACGATGAG
T. ovis	TSsr 250FN	CGCGTCTTCGGATG
	TSsr 630RN	AAAGACTCGTAAAGGAGCAA

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version ۲۱, SPSS Inc.) انجام شد. آزمون مربع‌کای برای ارزیابی ارتباط بین آلودگی انگلی، سن (کم‌تر از دو، دو و بیش‌تر از دو سال سن) و جنس دام‌ها استفاده شد. p<۰/۰۵ برای معنی‌دار بودن درنظر گرفته شد.

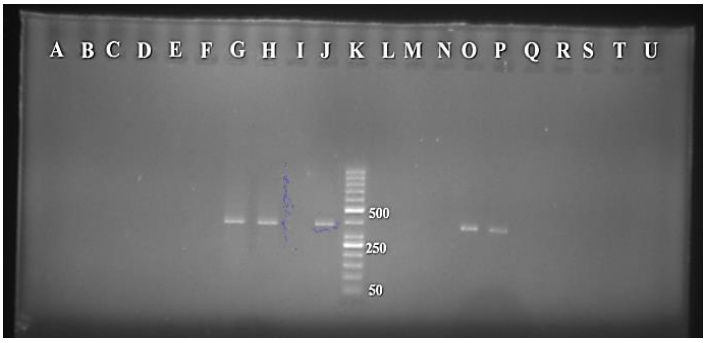
نتایج

تشخیص میکروسکوپی آلودگی خونی: در بررسی‌های میکروسکوپی گسترش‌های خونی، در هیچ‌یک از نمونه‌ها آلودگی تیلریایی تشخیص داده نشد.

تشخیص مولکولی آلودگی خونی: از مجموع ۱۶۶ نمونهٔ خون آزمایش‌شده باند مثبتی برای گونهٔ تیلریا لستوکاردی مشاهده نشد. همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، از مجموع ۱۶۶ نمونهٔ آزمایش شده، ۳۰ نمونه باندهای اختصاصی گونهٔ تیلریا اویس را نشان دادند.

بررسی توالی: بررسی توالی‌ها نشان داد که توالی قطعات تکثیر شده در مطالعهٔ حاضر به‌میزان ۱۰۰-۹۸ درصد با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن یکسان است. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در هیچ‌یک از توالی‌ها مشاهده نشد (شکل ۲). بررسی فیلوژنی نشان داد که توالی به‌دست آمده در مطالعه حاضر با بسیاری از توالی‌های به‌دست آمده از نقاط مختلف دنیا در سال‌های مختلف در یک مجموعه قرار گرفته و ارتباط نزدیکی با این توالی‌ها دارد. هم‌چنین توالی به‌دست آمده در مطالعه حاضر تا حدودی از برخی توالی‌های ثبت شده از چین، آفریقای جنوبی و هلند و به‌میزان بیش‌تر از توالی‌های به‌دست آمده از میانمار فاصله دارد (شکل ۳).

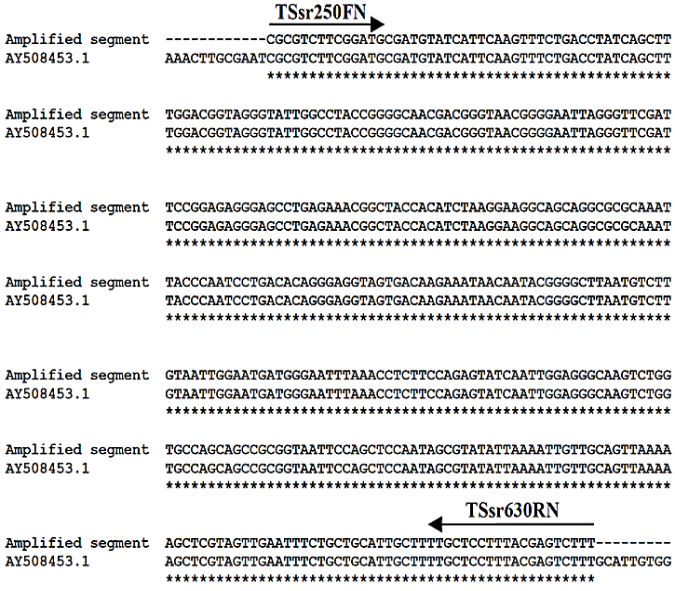
نتایج آنالیز آماری: نتایج آنالیز آماری بین متغیرهای مربوط به دام‌ها و میزان آلودگی تیلریوزیس در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR قطعهٔ ۳۹۸ جفت بازی از ناحیهٔ ژنی SSU rRNA گونهٔ تیلریا اویس روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون‌های G, H, O, P: نمونه‌های مثبت. ستون‌های A, B, C, D, E, F, L, M, N, Q, R, S, T, U: نمونه‌های منفی، ستون K: Ladder 50 bp، ستون J: کنترل مثبت، ستون I: کنترل منفی.

جدول ۳: ارتباط بین آلودگی تیلریا اویس و سن، جنس و گونهٔ دام

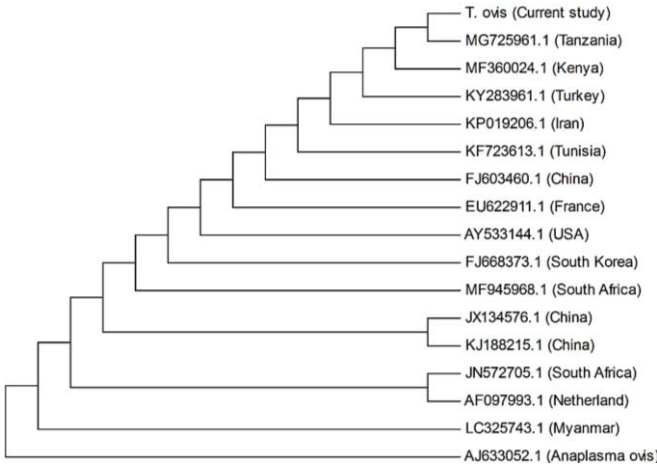
متغیرها	سن (سال)		جنس		گونه	
	≥۲	<۲	ماده	نر	گوسفند	بز
آلوده	۲۴	۶	۲۵	۵	۳۰	۰
غیر آلوده	۱۰۳	۳۳	۱۲۴	۱۲	۹۵	۴۱
کل	۱۲۷	۳۹	۱۴۹	۱۷	۱۲۵	۴۱
ارزش P	p>۰/۰۵		p>۰/۰۵			



شکل ۲: هم ترازی قطعهٔ ۳۹۸ جفت بازی تکثیر شده از ژن SSU rRNA مربوط به گونهٔ تیلریا اویس با توالی موجود در بانک ژن (GenBank: AY508453.1 NCBI)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: بررسی درخت فیلوژنی تیلریا اویس براساس توالی نسبی قطعه ژنی SSU rRNA

بحث

تیلریوزیس یک بیماری تک یاخته‌ای مهم به‌لحاظ اقتصادی در بین دام‌های اهلی ایران با میزان آلودگی کلی ۱۹٪ محسوب می‌شود. میزان کلی آلودگی در جمعیت گوسفندان ایران ۲۳٪ می‌باشد. بیش‌ترین موارد آلودگی در ایران در ماه‌های خرداد و تیر و کم‌ترین موارد آلودگی در ماه‌های اسفندو فروردین در شمال‌غربی و جنوب‌شرقی ایران به‌وقوع پیوسته است (Soosaraei و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج مطالعات مولکولی آلودگی تیلریایی در نقاط مختلف ایران عمدتاً حاکی از غالب بودن گونهٔ تیلریا اویس با درصدهای شیوع مختلف در بین نشخوارکنندگان کوچک است. به‌طوری‌که میزان شیوع تیلریا اویس در بین نشخوارکنندگان کوچک نیمهٔ شرقی ایران ۵۵/۳ درصد (Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۰۹)، در خراسان شمالی ۷۰ درصد (Rashidi و Razmi، ۲۰۱۳)، در شمال‌شرق ایران ۵۵/۶ درصد (Razmi و همکاران، ۲۰۱۳) و در اهواز ۹۱/۵ درصد (Jalali و همکاران، ۲۰۱۴) گزارش شده است. در صورتی‌که در مطالعهٔ Zaeemi و همکاران (۲۰۱۱) روی هم‌رفته گونهٔ تیلریا لستوکاردی (۵۴/۸٪) غالب بود. هم‌چنین، در استان آذربایجان غربی نشان داده شده است که ۶/۲۵ درصد از بزها آلوده به تیلریا لستوکاردی بودند (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۷). به‌هرحال، تنها دو گونهٔ تیلریا اویس و تیلریا لستوکاردی عوامل آلودگی تیلریایی در نشخوارکنندگان کوچک ایران هستند (Hashemi-Fesharaki، ۱۹۹۷)، اما تیلریا لستوکاردی در جنوب، جنوب غربی و جنوب شرقی ایران شیوع بالایی دارد (Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۱۰)، در حالی‌که تیلریااویس در کل کشور پراکنده است (Hashemi-Fesharaki، ۱۹۹۷) که این موضوع با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشته و می‌تواند توجیه‌گر عدم وجود گونهٔ تیلریا لستوکاردی در تحقیق حاضر باشد.

به‌لحاظ هم‌جواری، در مطالعات مشابه میزان شیوع تیلریا اویس در بین نشخوارکنندگان کوچک در شرق ترکیه ۵۴/۰۳ درصد (Altay و همکاران، ۲۰۰۵)، در شرق و شمال‌شرق آناتولی در بین گوسفندان ۵۸/۷۹ درصد و در بین بزها ۲۷/۱۱ درصد (Altay و همکاران، ۲۰۰۷) و در عربستان (Alanazi و همکاران، ۲۰۱۸) در بین گوسفندان ۴۶ درصد و در بین بزها ۳۳/۷ درصد، درصورتی‌که در مطالعات فوق آلودگی با تیلریا لستوکاردی گزارش نشده است. یافته‌های این سه مطالعه، حداقل از نظر عامل بیماری، با یافته‌های مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد. به‌نظر می‌رسد دلیل اختلافات در شیوع و عوامل آلودگی تیلریایی در مناطق مختلف می‌تواند تا حدودی مرتبط با اختلافات در مدیریت دام‌ها، نقل مکان گله، شرایط محیطی محل مطالعه، تغییرات محیطی اقلیمی، حساسیت میزبان، نژاد دام‌های مطالعه شده، فراوانی فصلی ناقل، بومی و یا غیربومی بودن میزبان ناقل، مقاومت کنه در برابر حشره‌کش‌ها، دفعات متعدد آلودگی با کنه در گوسفند، اقدامات پیشگیرانهٔ ناکافی، تعداد نمونه‌های آزمایش شده و میزان حساسیت روش‌های تشخیص آلودگی باشد (Riaz و همکاران، ۲۰۱۷؛ Soosaraei و همکاران، ۲۰۱۸؛ Alanazi و همکاران، ۲۰۱۸).

به‌طورکلی، نتایج مطالعات مولکولی قبلی در ایران نشان داده است که شیوع تیلریا اویس در بین نشخوارکنندگان کوچک در مناطق مختلف ایران خیلی متفاوت است (Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۱۰). مشابه با بیش‌تر مطالعات در ایران، در مطالعهٔ حاضر نیز تیلریا اویس عامل اصلی آلودگی تیلریایی در بین دام‌های مورد مطالعه محسوب می‌شود. در این مطالعه میزان تیلریوزیس ناشی از تیلریا اویس به‌مراتب کم‌تر از یافته‌های مطالعات انجام شده در ایران (Heidarpour-Bami و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zaeemi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Rashidi و Razmi، ۲۰۱۳؛ Razmi و همکاران، ۲۰۱۳ و Jalali و همکاران، ۲۰۱۴) بود، شاید دلیل کم‌تر بودن این میزان آلودگی متأثر از پایین بودن جمعیت دام‌های تحت مطالعه، رعایت موازین بهداشتی و یا درمان پیشگیرانه و درصورت وقوع بیماری، درمان به‌موقع دام‌های درگیر بوده باشد. البته از منظر دیگر باید به این نکته توجه کرد که از نظر خصوصیات آب و هوایی، نواحی آذربایجان دارای آب و هوای معتدل است و بیماری تیلریوزیس بیش‌تر در مناطق گرمسیر اتفاق می‌افتد، بنابراین این میزان آلودگی تیلریایی از جهتی می‌تواند بیش‌تر هم تلقی شود. شاید دلایل این رخداد تفاوت در زمان نمونه‌برداری، مبارزه یا عدم مبارزه سالانه با بیماری و ناقلین آن، تغییرات محسوس آب و هوایی سال‌های اخیر که باعث گرم‌شدن مناطق شمال‌غرب کشور شده و علل متعدد دیگر باشد. در این مطالعه بیش‌ترین درصد آلودگی مربوط به گوسفندهای بالاتر از دو سال و هم‌چنین نرها بود ولی اختلاف آماری بین میزان آلودگی و سن و جنس مشاهده نشد ($P>0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت سنی یکی از عوامل تأثیرگذار بر اپیدمیولوژی تیلریوزیس می‌باشد، این مقاومت نسبت به آلودگی در حیوانات جوان بستگی به ایمنی مادرزادی ندارد، هر چند در برخی موارد ایمنی مادرزادی ممکن است نقش مضاعف را ایفاء نماید که این حالت در تیلریا اویس دیده می‌شود (Uilenberg، ۱۹۹۵). اظهار نظرها در ارتباط با سن آلودگی دام‌ها متفاوت هستند. به‌طوری‌که در پاکستان (Riaz و همکاران، ۲۰۱۷؛ Iqbal و همکاران، ۲۰۱۱) و ترکیه (Aktas و همکاران، ۲۰۰۷) دام‌های کم‌تر از یک‌سال بیش‌ترین، ولی در یونان (Theodoropoulos و همکاران، ۲۰۰۶) دام‌های بیش‌تر از یک‌سال بیش‌ترین شیوع آلودگی را نشان داده‌اند. با این وجود، در تمامی این مطالعات این اختلافات معنی‌دار نبوده است. اگرچه در مطالعهٔ تیلریوزیس نشخوارکنندگان عربستان (Alanazi و همکاران، ۲۰۱۸) درصد آلودگی در دام‌های با سن بالا و به‌لحاظ گونه در گوسفندها بیش‌تر بود ولی اختلاف بین شیوع آلودگی و سن معنی‌دار و بین شیوع آلودگی‌وجنس غیرمعنی‌دار گزارش شده است.

Riazوهمکاران(۲۰۱۷) در پاکستان شیوع بالای آلودگی تیلریایی را در جنس‌های نر گزارش کرده‌اند، ولی این تفاوت معنی‌دار نبود. دلیل شیوع بالای آلودگی در جنس نر چنین توجیه شده است که در طول آبستنی، شیرواری و فحلی آلودگی کنه درماده‌ها کاهش می‌یابد و منجر به کاهش آلودگی تیلریایی می‌شود. هم‌چنین، در همین مطالعه شیوع مولکولی آلودگی تیلریایی در گوسفندها بیش‌تر از بزها گزارش شده است. دلایل شیوع بالای آلودگی با گونه‌های تیلریا در گوسفند به تفاوت ماهیت پوست در گوسفند و بز نسبت داده شده است. با این توضیح که پوست بز نازک است و در برابر اتصال کنه مقاوم‌تر از پوست گوسفند است. در ضمن، به‌دلیل وجود پشم در گوسفند، کنه‌ها به‌راحتی در پوست گوسفند به دام می‌افتند و موجب آلودگی تیلریایی می‌شوند (Riaz و همکاران، ۲۰۱۷).

بررسی توالی نشان داد که قطعهٔ تکثیر شده در مطالعهٔ حاضر به میزان بالایی با توالی‌های موجود در بانک ژن یکسانی دارد. این امر می‌تواند نشان‌دهنده میزان بالای حفاظت شدگی این ژن در بین سویه‌های مختلف تیلریا اویس باشد. اگرچه توالی مربوط به مطالعه حاضر با برخی توالی‌های به‌دست آمده از شرق و جنوب آسیا و آمریکا تفاوت داشت اما ژنوتیپ جدیدی نبوده و نزدیکی زیادی با توالی‌های به‌دست آمده از سایر نقاط دنیا دارد. درصورتی‌که تعیین توالی قطعات تکثیر شده از ژن ۱۸S rRNA، چهار سویهٔ جدید را برای تیلریا اویس جدا شده از نشخوارکنندگان کوچک عربستان (Alanazi و همکاران، ۲۰۱۸) نشان داده است.

در این مطالعه ۱۸٪ آلودگی با گونه تیلریا اویس در نشخوارکنندگان، صرفاً بر مبنای روش مولکولی مشاهده‌شد. نتیجه‌گیری می‌شود بیماری تیلریوزیس به شکل تحت بالینی در بین جمعیت نشخوارکنندگان کوچک استان آذربایجان‌شرقی وجود داشته و تیلریا اویس عامل اصلی تیلریوزیس را تشکیل می‌دهد. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های مشابه روی میزبان‌های واسط برای برآورد میزان آلودگی تیلریایی در آن‌ها انجام شوند و نهایتاً، راه‌کارهایی مناسب برای کنترل میزبان‌های واسط و عوامل تیلریایی در منطقهٔ مورد مطالعه ارائه شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح به شمارهٔ ۴۳/۸۷۶۷/د می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به‌خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به‌ثمر رسیدن این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱. **Aktas, M.; Altay, K. and Dumanli, N., 2007**. Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. Parasitol Res, Vol. 100, No. 4, pp: 797-802.

۲. **Aktas, M.; Altay, K. and Dumanli, N., 2005**. Survey of Theileria parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. Small Rumin Res, Vol. 60, No. 3, pp: 289-293.

۳. **Alanazi, A.D.; Said, A.E.; Ghoneim, A.M.; Alyousif, M.S. and Alanazi, I.O., 2018**. A comprehensive evaluation and first molecular report of *Theileria ovis* infection in small ruminants in Saudi Arabia. Trop Anim Health prod, DOI.org/10.1007/s11250-018-1663-y

۴. **Altay, K.; Aktas, M. and Dumanli, N., 2007**. Theileria infections in small ruminants in the East and Southeast Anatolia. Türkiye Parazitol Derg, Vol. 31, No. 4, pp: 268-271.

۵. **Altay, K.; Dumanlia, N.; Holmanb, P.J. and Aktas, M., 2005.** Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. Vet Parasitol, Vol. 127, No. 2, pp: 99-104.

www.SID.ir

Archive of SID

۶. **Durrani, A.Z.; Younus, M.; Kamal, N.; Mehmood, N. and Shakoori, A.R., 2011**. Prevalence of Ovine Theileria Species in District Lahore, Pakistan. Pakistan J Zool, Vol. 43, No. 1, pp: 57-60.

۷. **Foronda, P.; Casanova, J.C.; Valladares, B.; Martinez, E. and Feliu, C., 2004**. Molecular systematics of several cyclophyllid families (Cestoda) based on the analysis of 18S ribosomal DNA gene sequences. Parasitol Res, Vol. 93, pp: 279-282

۸. **Hadziavdic, K.; Lekang, K.; Lanzen, A.; Jonassen, I.; Thompson, E.M. and Troedsson, C., 2014**. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. PLoS ONE Vol. 9, No. 2, e87624. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0087624.

۹. **Hashemi-Fesharaki, R., 1997**. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parasitologia. Vol. 39, No. 2, pp: 115-117.

۱۰. **Heidarpour Bami, M.; Haddadzadeh, H.R.; Kazemi, B.; Khazraiinia, P.; Bandehpour, M. and Aktas, M., 2009**. Molecular identification of ovine Theileria species by a new PCR–RFLP method. Vet Parasitol, Vol. 161, No. 3-4, pp: 171-177.

۱۱. **Heidarpour Bami, M.; Khazraiinia, P.; Haddadzadeh, H.R. and Kazemi, B., 2010.** Identification of Theileria species in sheep in the eastern half of Iran using nested PCR RFLP and microscopic techniques. Iranian J Vet Res. Vol. 11, No. 3, pp: 262-266.

۱۲. **Inci, A.; Ica, A.; Yildirim, A. and Duzlu, O., 2010**. Identification of Babesia and Theileria species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. Turkey Journal of Vetaraniary Animal Sciences. Vol. 34, No. 2, pp: 205-210.

۱۳. **Iqbal, F.; Fatima, M.; Shahnawaz, S.; Naeem, M.; Shaikh, R.; Ali, M. and et al., 2011**. A study on the determination of risk factors associated with babesiosis and prevalence of Babesia sp., by PCR amplification, in small ruminants from Southern Punjab (Pakistan). Parasite. Vol. 18, No. 3, pp: 229-234.

۱۴. **Irshad, N.; Qayyum, M.; Hussain M. and Khan, Q., 2010**. Prevalence of tick infestation and theileriosis in sheep and goats. Pakistan Vetaraniary Journal. Vol. 30, No. 3, pp: 178-180.

۱۵. **Jalali, S.M.; Khaki, Z.; Kazemi, B.; Rahbari, S.; Shayan, P. and Bandehpour, M., 2014**. Molecular Detection and Identification of Theileria Species by PCR-RFLP Method in Sheep from Ahvaz, Southern Iran. Iranian J Parasitol. Vol. 9, No. 1, pp: 99-106.

۱۶. **Mohammadi, M.; Esmaeilnejad, B. and Jalilzadeh-Amin, Gh., 2017**. Molecular detection, infection rate and vectors of *Theileria lestoquardi* in goats from West Azerbaijan province, Iran. VRF. Vol. 8, No. 2, pp: 139-144.

۱۷. **Rashidi, A. and Razmi, G.R., 2013**. Molecular detection of Theileria spp. in sheep and vector ticks in the North Khorasan Province, Iran. Trop Anim Health Prod. Vol. 45, No. 1, pp: 299-303.

۱۸. **Razmi, G.R.; Eshrati, H. and Rashtibaf, M., 2006**. Prevalence of Theileria spp. infection in sheep in South Khorasan province, Iran. Vet Parasitol. Vol. 140, No. 3-4, pp: 239-243.

۱۹. **Razmi, G.R.; Pourhosseini, M.; Yaghfouri, S.; Rashidi, A. and Seidabadi, M., 2013**. Molecular detection of Theileria spp. and Babesia spp. in sheep and Ixodid ticks from the northeast of Iran. J Parasitol. Vol. 99, No. 1, pp: 77-81.

۲۰. **Riaz, M. and Tarawar, Z., 2017**. Identification of Theileria species (*Theileria ovis* and *Theileria lestoquardi*) by PCR in apparently healthy small ruminants in and around Multan, southern PUNJAB, PAKISTAN. J Anim Plant Sci. Vol. 27, No. 3, pp: 809-818.

۲۱. **Riaz, M.; Tasawar, Z. and Zaka Ullah, M., 2017**. A survey on molecular prevalence, intensity and associated risk factors

www.SID.ir

Archive of SID

for ovine and caprine theileriosis from southern Punjab, Pakistan. Pakistan J Life Soc Sci. Vol. 15, No. 3, pp: 150-157.

۲۲. **Soosaraei, M.; Motavalli Haghi, M.; Etemadifar, F.; Fakhar, M.; Hosseini Teshnizi, S.; Ziaei Hezarjaribi, H. and Asfaram, S., 2018**. Status of theileriosis among herbivores in Iran: A systematic review and Meta-analysis. Vet World. Vol. 11, No. 3, pp: 332-341.

۲۳. **Theodoropoulos, G.; Gazouli, M.; Ikonomopoulos, J.A.; Kantzoura, V. and Kominakis, A., 2006**. Determination of prevalence and risk factors of infection with Babesia in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. Vet Parasitol. Vol. 135, No. 2, pp: 99-104.

۲۴. **Uilenberg, G., 1995**. International collaborative research: Significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet Parasitol. Vol. 57, No. 1-3, pp: 19-41.

۲۵. **Zaeemi, M.; Haddadzadeh, H.; Khazraiinia, P.; Kazemi, B. and 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. Vol. 108, No. 4, pp: 837–843.

www.SID.ir