Archive of SID

تشخیص مولکولی تریکوموناس گالینه با استفاده از تکثیر ژن 5.8S rRNA به روش PCR در کبوتران خانواده کلمبیده (*Columbidae*)

مریم سلطانی عینی[۱]، موسی توسلی[۲*]، علی قریشی[۳]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۲. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۳. دانشیار،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه چارلز استوارت، واگا واگا- استرالیا.

دریافت: ۱۰ شهریور ماه ۹۴ **پذیرش:** ۳ مرداد ماه ۹۵

چکیده

تریکوموناس‌گالینه تک‌یاخته تاژکداری است که عامل ایجاد تریکومونیاز پرندگان می‌شود. این انگل گسترش جهانی دارد و آلودگی با این انگل در اکثر پرندگان بدون علامت است. درحال حاضر تشخیص ارگانیسم با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی شامل گسترش مرطوب، کشت و روش‌های مولکولی است. در این مطالعه بر آن شدیم تا با استفاده از روش مولکولی Polymerase Chain Reaction (PCR) و بر اساس تکثیر ژن 5.8S rRNA تریکوموناس‌گالینه، آلودگی کبوتران را بررسی و نتایج آن را با روش گسترش مرطوب مقایسه کنیم. نمونه‌ها از ۷۲ قطعه کبوتر خانواده کلمبیده که شامل ۲ قطعه قمری خانگی، ۸ قطعه کبوتر چاهی و ۶۲ قطعه کبوتر اهلی با استفاده سوآپ استریل از محوطه دهانی و چینه‌دان گرفته شد و هر نمونه به دو قسمت تقسیم کردند. یک قسمت آن فوراً با آزمایش گسترش مرطوب و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت که به طور کلی ۱۸ نمونه با این روش مثبت تشخیص داده شد. قسمت دیگر نمونه به منظور انجام واکنش PCR اختصاصی با استفاده از یک جفت پرایمر از ناحیه حفاظت شده ژن ریبوزومی 5.8S تریکوموناس گالینه مورد استفاده قرار گرفت که ۲۴ نمونه با این روش مثبت تشخیص داده شد. با توجه به نتایج مولکولی به دست آمده با استفاده از پرایمرهای Trich-1F و Trich-1R اندازه باندهای حاصل از PCR کبوتران خانواده کلمبیده، ۳۹۰ جفت باز مشاهده شد؛ همچنین می‌توان گفت که تست PCR حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به آزمایش گسترش مرطوب دارد.

واژه‌های کلیدی: تریکوموناس گالینه، تشخیص مولکولی، ژن 5.8SrRNA، کبوتران خانواده کلمبیده، PCR.

مقدمه

تریکوموناس‌گالینه تک‌یاخته تاژکداری است که در سراسر جهان منتشر شده و عامل ایجاد تریکومونیاز در پرندگان است (۱). کبوتران اهلی و وحشی به ویژه کبوتران خانواده کلمبیده میزبان اصلی آن هستند. این انگل در سایر پرندگان نظیر بوقلمون، بلدرچین، انواع فنچ، گنجشک، قناری‌ها و همچنین در پرندگان شکاری همچون باز و قوش نیز دیده شده است (۲).

تریکوموناس‌گالینه اساساً در قسمت‌های بالایی سیستم گوارش و تنفس (دهان، سینوس‌ها، گلو، مری و چینه‌دان) پرندگان مستقر است و بسته به سویه، می‌تواند در سایر ارگان‌ها مانند کبد، استخوان، سینوس‌های جمجمه، ریه، کیسه‌های تنفسی، حفره صفاقی و پانکراس نیز راه یابد. پرندگان بالغ حاملان این انگل هستند و عوارض زیادی از خود نشان نمی‌دهند و عوارض بیشتر در جوجه‌های پرندگان دیده می‌شود (۳). انتقال تریکوموناس‌گالینه در

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: mtavassoli2000@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

کبوترها مستقیم است و از راه دهان و تغذیه با شیره تغذیه‌ای والدین صورت می‌گیرد؛ همچنین آلودگی پرندگان شکاری می‌تواند از طریق مصرف سایر پرندگان آلوده به تریکوموناس باشد (۲).

بیماری بیشتر در پرندگان جوان دیده می‌شود و اغلب هم کشنده است. این انگل سویه‌های متفاوتی از تحت حاد تا فوق‌حاد دارد و می‌تواند بسته به حساسیت پرنده منجر به ایجاد بیماری با شدت‌های متفاوت گردد. پرندگان آلوده ممکن است تغذیه نکنند و از این رو کاهش وزن، ژولیدگی پرها، ضعف و بی‌حالی قبل، از مرگ در آن مشاهده کرد و نیز ممکن است مایعات زرد مایل به سبز در دهان پرنده دیده شود. با ادامه روند بیماری و مزمن شدن آن توده‌های نکروزه سخت پنیری در ناحیه حلق و مری پرندگان پدید می‌آید که موجب اشکال در عمل بلع و تنفس می‌گردد. ضایعات ممکن است حتی سینوس‌های سر را نیز درگیر کنند و در موارد نادر حتی نفوذ به احشا و تشکیل نواحی نکروزه در کبد، طحال، پانکراس، قلب، ریه‌ها و کیسه‌های هوایی نیز دیده شده است. کبوترهایی که پس از ابتلا به یک سویه حاد نجات یافته‌اند، در برابر آلودگی ایمن می‌شوند (۴).

هم اکنون مهم‌ترین و سریع‌ترین روش برای تشخیص تریکوموناس‌گالینه، تشخیص میکروسکوپی انگل با آزمایش گسترش مرطوب است که حساسیت این روش تقریباً ۶۰ درصد گزارش شده است (۵). مطالعه میکروسکوپی کشت‌های اختصاصی حاوی انگل، حساسیت را به ۸۵ تا ۹۵ درصد رسانده است (۶-۸). در هر صورت کیفیت آزمایش‌های تشخیصی به میزان زیادی بستگی به تخصص و تجربه فردی که با میکروسکوپ کار می‌کند و همچنین کیفیت نمونه دارد؛ بنابراین نیاز به بهبود روش‌های تشخیص بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۶ و ۷). از روش‌های مولکولی متفاوتی برای تشخیص این انگل استفاده شده است که از میان آن‌ها می‌توان به PCR , Fluorescent in suit hybridization و Oligonucleotide probing اشاره کرد. با توجه به اهمیت روزافزون این بیماری و شیوع بالای آن در بین پرندگان، تاکنون تنها پژوهش‌های مولکولی محدودی روی تریکوموناس‌گالینه در گونه‌های مختلف پرندگان صورت گرفته است. در این پژوهش، تشخیص تریکوموناس‌گالینه با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در نمونه‌های سوآپ دهانی پرندگان خانواده کلمبیده ارجاع شده به بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی ارومیه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

از ۷۲ قطعه کبوتر خانواده‌ی کلمبیده ۲ قطعه قمری خانگی، ۸ قطعه کبوتر چاهی و ۶۲ قطعه کبوتر اهلی -که از فروردین ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۴ که از مناطق مختلف شهرستان ارومیه و همچنین کبوتران ارجاعی به بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی ارومیه- نمونه محوطه دهانی و چینه‌دان با سوآپ استریل اخذ شد و هر نمونه به دو قسمت تقسیم گردید. یک قسمت به منظور انجام آزمایش گسترش مرطوب برای تشخیص انگل تریکوموناس فوراً مورد استفاده قرار گرفت و قسمت دیگر در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر نگه‌دارنده PBS استریل PH=7/2 قرار داده شد و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به منظور انجام PCR اختصاصی برای تشخیص انگل منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده با روش گسترش مرطوب و PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش گسترش مرطوب ترشحات اخذ شده از محوطه دهانی پرندگان در یک قطره سرم فیزیولوژی حل و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰× مورد بررسی قرار گرفتند. برای جداسازی DNA نمونه‌هایی که درPBS استریل نگه‌داری شده بودند، از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن، ایران) استفاده شد. DNA های استخراج شده تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش PCR روی تمام نمونه‌ها انجام گرفت. برای انجام PCR از یک جفت پرایمر به نام‌های Trich-1F و Trich-1R که از ژن 5.8SrRNA مشتق شده، استفاده که ترادف نوکلئوتیدی این پرایمرها به شرح زیر است (۴):

Trich-1Forward:
(5-ATGAGTCAACACACGCCATCAG-3)
Trich-1Reverse:
(5-CACCTGGACGTCTGTGACCTTC-3)

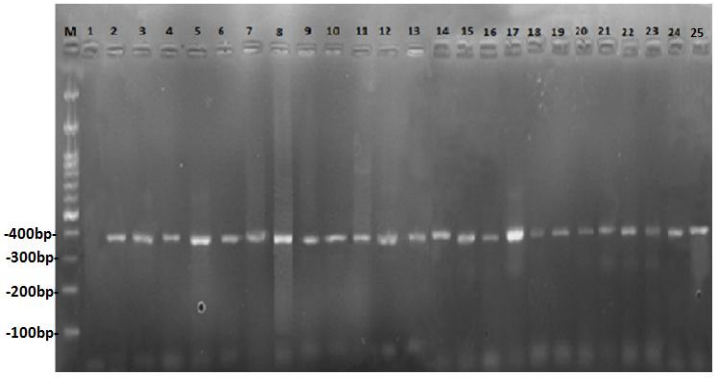
واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۵ میکرومول Mgcl2، ۱/۵ واحد Taq DNA پلی‌مراز (شرکت سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از پرایمرها انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۳۵ سیکل بود که مرحله دناتوراسیون (denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، آنیلینگ (annealing) در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و اکستنشن (extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام پذیرفت و مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نیز صورت گرفت. یک مرحله دناتوراسیون نیز، پیش از شروع سیکل‌ها در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سرانجام، پس از پایان PCR، ۸ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید منتقل گردید و الکتروفورز در بافر (50mMTris, 50mMBorate, 1mMEDA)(0.5×)TBE در جریان ثابت ۸۰ ولت به انجام رسید و ژل پس از الکتروفورز با دستگاه ترانس لومیناتور در زیر نور UV بررسی شد.

نتایج

از ۷۲ قطعه کبوتر، تعداد ۲۴ پرنده شامل ۲ قطعه قمری خانگی با نام علمی *Spilopelia senegalensis*، ۳ قطعه کبوتر چاهی با نام علمی *Columba livia* و ۱۹ قطعه کبوتر اهلی با نام علمی *Columba livia domestica* با روش آزمایش گسترش مرطوب و روش مولکولی، مثبت تشخیص داده شدند.

با انجام آزمایش PCR، تعداد ۲۴ نمونه شامل: ۲ نمونه قمری خانگی و ۳ نمونه کبوتر چاهی و ۱۹ نمونه از کبوتران اهلی، مثبت تشخیص داده شدند.

با انجام آزمایش گسترش مرطوب تعداد ۱۸ نمونه، مثبت تشخیص داده شد. از موارد مثبت ۲ نمونه قمری خانگی، ۳ نمونه کبوتر چاهی و ۱۳ نمونه کبوتر اهلی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده، باندهای تشکیل شده حاصل از PCR در تمام نمونه‌ها، با وزن ۳۹۰ جفت باز مشاهده شده است (شکل ۱).



شکل ۱- تشخیص تریکوموناس گالینه با روش PCR و پرایمرهای Trich-1F و Trich-1R ، خط M به عنوان نشانگر، خط ۱ کنترل منفی و خطوط ۲ الی ۲۰ باندهای مربوط به نمونه‌های کبوتران اهلی، خطوط ۲۱ و ۲۲ باندهای مربوط به قمری خانگی و خطوط ۲۳، ۲۴ و ۲۵ باندهای مربوط به نمونه‌های کبوتر چاهی هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

آلودگی با تریکوموناس‌گالینه در پرندگان به طور معمول می‌تواند بدون علامت باشد و یا به صورت بیماری شدید نمایان شود؛ همچنین وجود سویه‌های مختلف با آسیب‌های بافتی متفاوت نیز در شدت بیماری موثر است که بعضی سویه‌ها باعث مرگ و میر بالا در کبوتران و قمری‌ها می‌شود (۹). علائم کلینیکی تریکوموناس‌گالینه در کبوتران به ندرت دیده می‌شود و کبوترانی که آزمایش گسترش مرطوب آن‌ها به طور مداوم مثبت باشد احتمال کمتری برای زنده ماندن در فاصله ۲ سال را دارند (۱۰).

در پژوهش‌های دیگر شیوع تریکوموناس‌گالینه در کبوتران ایران بین ۳۷/۳۲٪ الی ۵۷٪ گزارش شده است (۱۱ و ۱۲). پژوهش حاضر نشان می‌دهد علاوه بر آلودگی کبوتران اهلی، آلودگی قمری و کبوتران چاهی نیز به تریکوموناس‌گالینه وجود دارد.

با توجه به شیوع بالای تریکوموناس‌گالینه در پرندگان به ویژه در کبوتران، تشخیص سریع و درمان به موقع آلودگی اهمیت زیادی دارد. روش‌های مختلف برای تشخیص تریکومونیاز ارزیابی شده است. تشخیص قطعی آلودگی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی است که شامل آزمایش گسترش مرطوب، کشت و آزمایش‌های مولکولی است که در حال حاضر مهم‌ترین و کاربردی‌ترین روش مولکولی، PCR است.

امروزه با پیشرفت تکنولوژی، روش‌های مولکولی در تشخیص و تعیین هویت انگل‌ها بیشترین استفاده را دارد. با توجه به اهمیت تریکوموناس‌گالینه پژوهش‌های اندکی در زمینه تفاوت ژنتیکی بین پرندگان خانواده کلمبیده صورت گرفته است. شناسایی توالی rDNA به دست آمده از یک ارگانیسم می‌تواند در شناسایی میزان تفاوت ژنتیکی بین ارگانیسم‌ها مهم باشد؛ بنابراین به طور بالقوه در تشخیص سویه و یا گونه‌ها به ویژه در پژوهش‌های اپیدمیولوژیکی مفید است؛ همچنین نواحی ITS1/5.8S/ITS2 به طور معمول برای شناسایی پلی‌مورفیسم بودن ارگانیسم‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد (۱۳).

پژوهش‌های فیلوژنتیک خانواده تریکومونادیده تنوع در بین گونه‌ها در ناحیه ITS1/5.8S/ITS2 را نشان داده است (۱۴ و ۱۵)؛ همچنین در پژوهش‌های صورت گرفته بر روی تریکوموناس‌گالینه کبوتران جزیره موریس بین ایزوله‌های تریکوموناس گالینه در ناحیه ITS1/5.8/ITS2 rDNA هیچ نوع تفاوتی مشاهده نشد و توالی ژنی یکسانی داشتند؛ اما تنوع ژنوتیپی معنی‌دار بین ایزوله‌ها وجود داشت که به نظر می‌رسد این تنوع ژنوتیپی به توزیع جغرافیایی پرندگان مرتبط باشد (۹).

در آزمایشگاه‌های تشخیصی روش گسترش مرطوب متداول‌ترین روش برای تشخیص تریکوموناس‌گالینه در پرندگان است. در بعضی موارد خطای شخص آزمایش کننده و ابزار آزمایشگاهی باعث کاهش اعتبار آزمایش گسترش مرطوب می‌شود. به طور کلی در شرایط معمول به ویژه زمانی که تعداد انگل در نمونه گرفته شده کم باشد در اکثر موارد آزمایش گسترش مرطوب منفی کاذب گزارش می‌شود؛ بنابراین تنها استناد به انجام آزمایش گسترش مرطوب برای تشخیص کافی نیست. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به آزمایش گسترش مرطوب دارد.

منابع

1- Stabler, R.M; *Trichomonas gallinae*: a review. Exp.Parasitol; 1954; 3: 368-402.
2- Lemahieu, P. and Dehondt, G; Trichomonisis bij kanaries. Vlaams.Diergen. Tijds; 1977; 46: 442-3.

www.SID.ir

Archive of SID

3- Narcisi, E.M; Sevoian, M. and Honigberg, B.M; Pathologic Changes in Pigeons Infected with a Virulent *Trichomonas gallinae* Strain (Eiberg). Avian Dis.; 1991; 35(1): 55-61.

4- Forzan, M.J; Vanderstichel, R; Melekhovets, Y.F. and McBurney, S; Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces An emerging disease. Can. Vet. J; 2010; 51(4): 391-6.

5- Fouts, A.C. and Kraus, S.J; *Trichomonas vaginalis:* reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J. Infect. Dis; 1980; 141(2): 137-43.

6- Gelbart, S.M; Thomason, J.L; Osypowski, P.J; James, J.A. and Hamilton, P.R; Comparison of Diamond's medium modified and Kupferberg medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. J. Clin. Microbiol; 1989; 27(5): 1095-6.

7- Gelbart, S.M; Thomason, J.L; Osypowski, P.J; Kellett, A.V; James, J.A. and Broekhuizen, F.F; Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. J. Clin. Microbiol; 1990; 28(5): 962-4.

8- Schmid, G; Matheny, L; Zaidi, A. and Kraus, S; Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. J.Clin.Microbiol; 1989; 27: 1230-3.

9- Gaspar da Silva, D; Barton, E; Bunbury, N; Lunness, P; Bell, D.J. and Tyler, K.M; Molecular identity and heterogeneity of *Trichomonad* parasites in a closed avian population. Infect.Genet.Evol; 2007; 7(4):433-40.

10- Bunbury, N; Jones, C.G; Greenwood, A. and Bell, D.J; Epidemiology and conservation implications of *Trichomonas gallinae* infection in the endangered Mauritian pink pigeon. Biol.Conserv; 2008; 141:153-61.

11- Nematollahi, A; Ahmadi, A; Ebrahimi, M. and Mohammadpour, H; Prevalence of *Haemoproteus columbae* and *Trichomonas gallinae* in pigeons (Columba domestica) in Isfahan, Iran. J. Parasit. Dis; 2012; 36(1):141-2.

12- Borji, H; Razmi, G.H; Moghaddas, E; Azad, M. and Movassaghi, A.H; Prevalence and pathological lesion of *Trichomonas gallinae* in pigeons of Iran. J. Parasit. Dis; 2011; 35(2): m186-9.

13- Zingales, B; Stolf, B.S; Souto, R.P; Fernandes, O. and Briones, M.R; Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi*

www.SID.ir

Archive of SID

lineages based on ribosomal RNA sequences. Mem. Inst; 1999; 94: 159-64.

14- Felleisen, R.S; Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology; 1997; 115: 111-9.

15- Kleina, P; Bettim-Bandinelli, J; Bonatto, S.L; Benchimol, M. and Bogo, M.R; Molecular phylogeny of *Trichomonadidae* family inferred from ITS1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. Int. J. Parasitol; 2004; 34: 963-70.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular detection of *Trichomonas gallinae* by using of 5.8S rRNA gene by PCR reaction in *Columbidae* birds

Soltanieini, M.[1]; Tavassoli, M.[2*]; Ghorashi, A.[3]

1. PhD student, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
2. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
3. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Charles Sturt University, Wagga Wagga- Australia.

Recieved: 1 September 2015 ***Accepted:*** 23 May 2016

Summary

Trichomonas gallinae is flagellated protozoan that caused avian trichomonosis. This organism is widespread in clombiforms. In most cases infection with *T.gallinae* in birds can be asymptomatic. Currently, diagnosis of the organism is by laboratory assays included wet spread, in vitro culture and molecular methods**.** In this study, using by Polymerase Chain Reaction (PCR) method and based on 5.8S rRNA gene amplification *T.gallinae* examined and the results compared with wet test. This study carried out for investigation of trichomonase contamination of 72 pigeon of clombidae family that included 2 Laughing Dove (*Spilopelia senegalensis),* 8 Rock Dove *(Columba livia)* and 62 Domestic Pigeon *(Columba livia domestica)*. In this examination the samples were gathered from mouth and larynx of those pigeons by soap and then each sample was divided into two parts. Immediately a part of it was inspected via wet spread slide method that 18 positive samples were detected with this method. Another part of sample was used for specific PCR reaction using a primer pair of 5.8S ribosomal gene protected region was used *T.gallinae* with this method 24 positive samples were detected. The molecular results showed that PCR with primers Trich-1Fand Trich-1R yielded 390-base pair amplicon. As well as it can be saied the PCR test is higher sensitivity and specificity than wet test.

Keywords*: Trichomonas gallinae*, Molecular detection, 5.8SrRNA gene, *Columbidae* birds, PCR.

* Corresponding Author E-mail: mtavassoli2000@yahoo.com

www.SID.ir