



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

روح اله فتاحی^۱، پرویز شایان^۱، الهه ابراهیمزاده^۲، نرگس امینی نیا^۱

^۱ مرکز کنه و بیماری‌های منتقله از آن، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

doi 10.22059/jvr.2018.241840.2702

تاریخ دریافت: ۲۳ شهریور ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۱۶ آذر ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه 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.

روش کار: 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 هیچ کدام از نمونه‌ها آلودگی به بازیا 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 می‌توان از ژن های TamS1 و TaSp به منظور تشخیص اختصاصی تیلریا با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (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، تهران، ایران
پست الکترونیکی: pshayan@ut.ac.ir

مقدمه

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 از جمله هیالوما، همافیزالیس، آمبلیوما و ریپی سفالوس

گونه‌های تیلریا، نشخوارکنندگان اهلی و وحشی را در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری آلوده می‌کنند. تاکنون حداقل ۶ گونه تیلریا در نشخوارکنندگان کوچک گزارش شده 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 گزارش شده‌اند. اما

استخراج DNA: عملیات استخراج DNA با استفاده از کیت (DNA extraction Kit, MBST, Iran) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به طور 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 دناتور 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 سانتریفیوژ شدند. بعد از دو بار شستشو با بافر شستشو، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر بافر حل‌کننده و انکوبه کردن آن‌ها 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 به منظور تأیید 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 میکرو لیتر از هر کدام از آغازگرها (۲۰ میکرومولا)، ۲ میکرو لیتر dNTP (۱۰ میلی مولار از هر نوکلئوتید)، ۳ میکرو لیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرو لیتر ۱۰x PCR buffer و ۰/۵ میکرو لیتر ۲/۵ Taq polymerase (سیناژن، ایران) در حجم نهایی ۱۰۰ میکرو لیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 ۶۸۶ bp بود.

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

اسپروزیوت‌های 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 گزارش شده است. تیلریا لستوکاردی در نقاط مختلف ایران خصوصاً مناطق غرب و جنوب غربی گزارش شده است در حالی که تیلریا اویس در تمام کشور مشاهده شده است (۱۳،۱۴،۴۰). تیلریا آنولاتا نیز اخیراً در چند مطالعه در گوسفند و بز در ایران گزارش شده 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 این گونه تیلریا می‌باشد (۵،۱۳). عامل انتقال این گونه تیلریا کنه‌ی هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم می‌باشند (۱۵،۳۹). عده‌ای از محققین معتقدند که تیلریا لستوکاردی به وسیله ریپی سفالوس بورسا و احتمالاً ریپی سفالوس سانگوئی نوس نیز منتقل می‌شود (۲۷). اما تیلریا اویس به وسیله گونه‌های کنه ریپی سفالوس بورسا (۱)، ریپی سفالوس اورتسی (۲۴) و ریپی سفالوس سانگوئی نوس (۳۷) منتقل می‌شود (۲۶).

به منظور تشخیص تیلریوز روش‌های مختلفی استفاده شده است از جمله نشانه‌های بالینی، آنالیز میکروسکوپی خون با رنگ آمیزی گیمسا، تست‌های سرولوژیکی و روش‌های مولکولی بر اساس آنالیز DNA (۲۲،۳۵). روش‌های مولکولی از جمله 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 روش کار

نمونه‌های خون: در این مطالعه تعداد ۲۰۰ نمونه خون گوسفند مورد بررسی قرار گرفت که در گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی جمع‌آوری شده بود. نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد نگه‌داری شدند که قبل از استخراج DNA به طور کامل الکل گیری شدند.

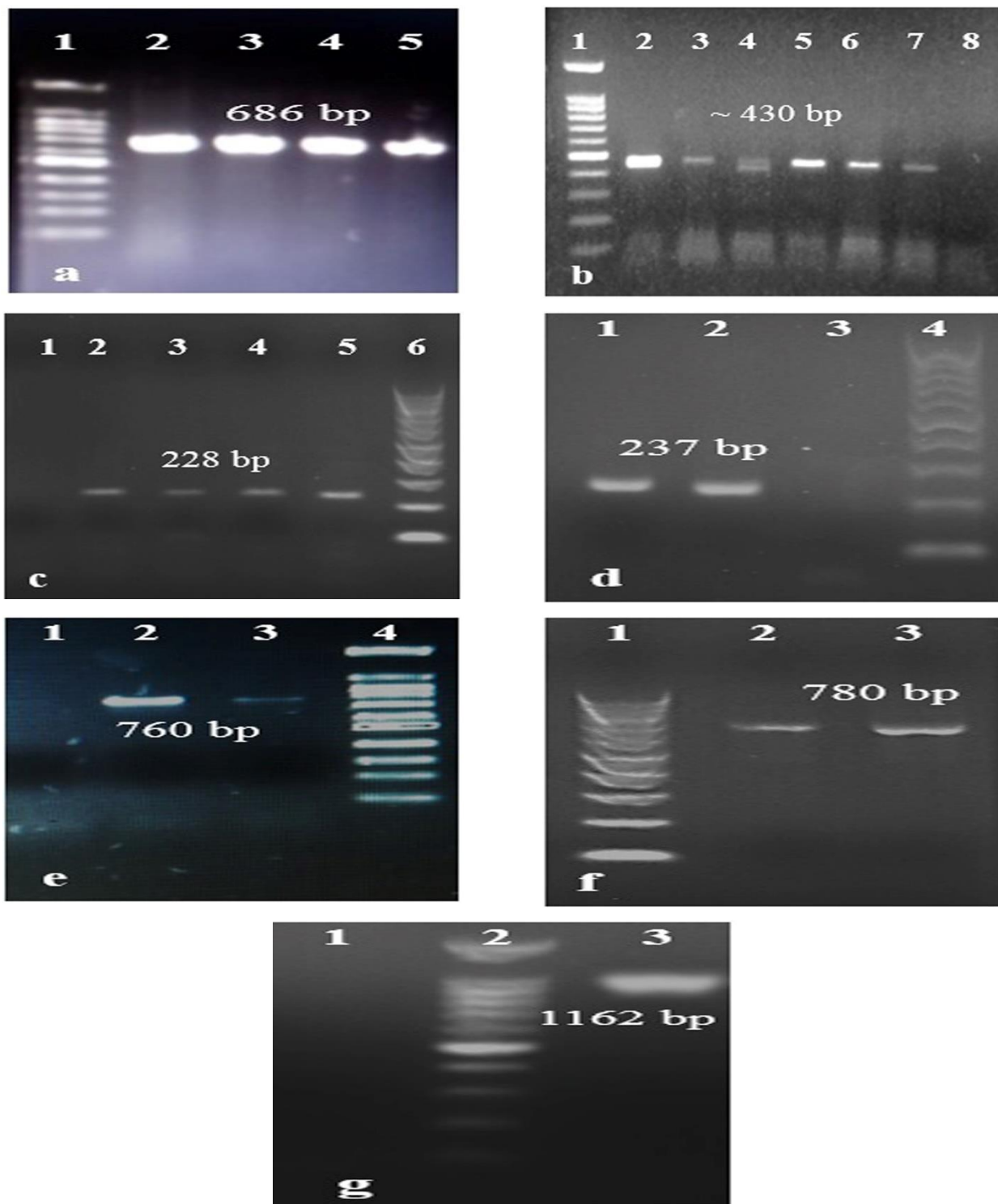
PCR روی ژن Tams1: با توجه به اینکه با روش Semi-nested PCR و توسط ژن 18S rRNA نمی‌توان تیلیریا آنولاتا را از تیلیریا لستوکاردی تفریق کرد. جهت تفریق این دو گونه تیلیریا از ژن Tams 1 استفاده شد. بدین منظور دو پرایمر فوروارد و یک پرایمر ریورس مشترک بین دو گونه تیلیریا روی ژن مذکور طراحی شد. پرایمر P7 که اختصاصی تیلیریا لستوکاردی می‌باشد (شماره دسترسی در بانک ژنتیک AJ006448.1)، پرایمر P8 که اختصاصی تیلیریا آنولاتا می‌باشد (شماره دسترسی در بانک ژنتیک AB917302.1) و پرایمر P9 که پرایمر ریورس می‌باشد و بین ژن Tams1 هر دو گونه تیلیریا لستوکاردی و آنولاتا مشترک می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 تیلیریا لستوکاردی و تیلیریا آنولاتا به ترتیب ۷۶۰ bp و ۷۸۰ bp بود.

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 تیلیریا و بابزیا مشترک هستند و می‌توان با این جفت پرایمر جنس تیلیریا 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 تیلیریا ۴۲۶-۴۳۰ bp و برای گونه‌های بابزیا ۳۸۹-۴۰۲ bp بود.

Semi-nested PCR: پس از تشخیص گونه‌های تیلیریا، روی محصولات PCR حاصل از پرایمرهای P3/P4 روش Semi-nested PCR جهت تشخیص تفریقی گونه‌های تیلیریا انجام شد. بدین منظور دو پرایمر فوروارد شامل P5 که اختصاصی گونه‌ی تیلیریا /ویس می‌باشد و P6 که اختصاصی گونه‌های تیلیریا لستوکاردی و تیلیریا آنولاتا می‌باشد. پرایمر P4 به‌عنوان ریورس استفاده شد. محصول PCR مورد انتظار برای پرایمرهای P5/P4 و P6/P4 به ترتیب ۲۲۸ bp و ۲۳۷ bp بود. همچنین دمای آنیلینگ برای هر دو جفت پرایمر ۵۴ درجه سانتی‌گراد 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'-CTGGAGACTGAGCAGTCTG-3'	
P3	18S rRNA	AF081135	5'-CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3'	Theileria spp. 426-430
P4		GU726904		
		AY260178		
P5		AF081135		
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		AJ316260.1	5'-CACATATCCAAGTTTCAGTC-3'	1162
P11	TaSp	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.

آلودگی توأم تیلیریا اویس با تیلیریا لستوکاردی یا تیلیریا 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 تیلیریا لستوکاردی و تیلیریا آنولاتا، به منظور 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، تیلیریا لستوکاردی یا تیلیریا آنولاتا مثبت بودند و همچنین ۴ نمونه‌ای که آلودگی توأم تیلیریا اویس و تیلیریا لستوکاردی یا تیلیریا آنولاتا داشتند با استفاده از پرایمرهای P7/P9 و P8/P9 که به ترتیب اختصاصی تیلیریا لستوکاردی و تیلیریا آنولاتا بودند، تحت PCR قرار گرفت. از ۱۴ نمونه‌ی مورد بررسی، ۱۲ نمونه به تیلیریا لستوکاردی و ۲ نمونه به تیلیریا 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 تیلیریا لستوکاردی می‌باشند (تصویر ۱، e, f). لازم به ذکر است که هیچ‌کدام از نمونه‌های آلوده به تیلیریا اویس با استفاده از این دو جفت پرایمر تکثیر داده نشدند و PCR آن‌ها منفی شد.

پس از تشخیص تفریقی گونه‌های تیلیریا 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 تیلیریا حاصل از ژن‌های 18S rRNA، Tams1 و TaSp، تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی نشان داد که محصولات PCR ژن 18S rRNA تیلیریا لستوکاردی به ترتیب شباهت ۹۹ و ۹۵ درصدی با محصولات PCR ژن 18S rRNA گونه‌های تیلیریا آنولاتا و تیلیریا اویس دارد. ژن Tams1 تیلیریا لستوکاردی و تیلیریا آنولاتا شباهت ۸۶ درصدی را نشان دادند. و مقایسه نتایج تعیین توالی ژن TaSp تیلیریا اویس در مقایسه با تیلیریا آنولاتا و تیلیریا لستوکاردی شباهت ۹۶ و ۸۶ درصدی را نشان داد. تفاوت عمده ژن TaSp تیلیریا لستوکاردی در مقایسه با دو گونه تیلیریا دیگر در ناحیه N-terminus این ژن مشاهده شد.

تکثیر ژن TaSp: پس از تشخیص تفریقی گونه‌های تیلیریا 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 تیلیریا لستوکاردی، تیلیریا اویس و تیلیریا آنولاتا انجام پذیرفت. بدین منظور با استفاده از جفت پرایمر P10 و P11 که مشترک بین سه گونه ذکر شده می‌باشد، ژن TaSp این گونه‌ها 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 تیلیریا حاصل از ژن‌های 18S rRNA و Tams1، TaSp، جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

نتایج

در مورد تعدادی از DNA های استخراج شده با استفاده از جفت پرایمر P1/P2 ژن بتا اکتین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد و DNA های استخراج شده مورد تأیید قرار گرفتند (تصویر ۱، a).

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

بحث

انگل و سپس پروتئین‌های نوترکیب حاصل از ژن‌های مختلف انگل از جمله TaSp (۳)، TaD (۳۰)، TaSe (۲۹) و TaHSP70 (۳۳) مورد استفاده قرار گرفته‌اند که با نتایج مختلفی همراه بوده‌اند. در مقایسه این پروتئین‌های نوترکیب، تیترا بسیار بالای آنتی‌بادی در برابر پروتئین نوترکیب TaSp در مقایسه با سایر پروتئین‌ها مشاهده شده است (۳۳). روش‌های سرولوژیکی روشی مناسب برای تشخیص فاز بیماری تیلریوز می‌باشند و می‌توان با این روش‌ها حیواناتی را که قبلاً مبتلا به تیلریوز شده و بهبود یافته‌اند 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 (۲۲، ۲۱، ۱۸، ۷). اما روش‌های مولکولی منطبق‌ترین روش برای تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف تیلریا می‌باشند. روش‌های مولکولی مختلفی برای تشخیص تفریقی گونه‌های تیلریا استفاده شده است و این روش‌ها دارای حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برای تشخیص تیلریوز می‌باشند. به طوری که 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 گزارش شده است (۲۰، ۸، ۲).

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

در اکثر مطالعات انجام گرفته به منظور تفریق گونه‌های تیلریا از ژن 18S rRNA استفاده گردیده است. به طور 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).

Zaemi 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 مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۲۵۰ نمونه خون مورد بررسی با روش PCR، ۸۲ مورد تیلریا مثبت بودند که از این تعداد، ۴۵ و ۳۳ نمونه به ترتیب آلوده به

تیلریوز بیماری مهم گوسفندان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد که به وسیله 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 از جمله 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 گزارش شده است (۱۷، ۴۰). این گونه نیز در نشخوارکنندگان کوچک غیر بیماریزا می‌باشد (۴). تیلریوز حاد دارای علائم بالینی از جمله 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 گزارش شده است که دو گونه‌ی تیلریا لستوکاردی، تیلریا اویس شیوع بالایی در نشخوارکنندگان کوچک در ایران دارند (۱۷، ۴۰).

روش‌های مختلفی برای تشخیص تیلریوز استفاده شده 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 به آسانی، 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 از جمله روش‌های مولکولی و نیاز به مهارت و تجربه‌ی بالای فرد آزمایش‌کننده جهت تشخیص درست تیلریوز را برشمرد (۳۶، ۳۸، ۲۲، ۶).

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 استفاده شده است. در هر کدام از این روش‌های سرولوژیکی مورد استفاده، از آنتی‌ژن‌های مختلفی استفاده شده است از جمله در ابتدا از شیزونت و اشکال پیروپلاسمی

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 به منظور 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 به صورت اختصاصی گونه‌های تیلریا را از هم تفریق نمود.

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

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).

Rahbari و Shayan 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 1-2 Tams 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، به منظور تفریق گونه‌های تیلریا با روش PCR در میزبانان مختلف، از ژن 18S rRNA استفاده شده است. اما ژن Tams نیز در برخی مطالعات در ایران و سایر نقاط به منظور تفریق گونه‌های تیلریا استفاده شده است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۹، ۳۵).

References

- 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
- 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
- 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
- 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
- Cicek, H., Cicek, H., Eser, M., Tandogan, M. (2009). Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey. *Turkiye Parazit Derg*, 33(4), 273-279.
- 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.
- De Vos, A., Roos, J. (1981). The isolation of *Theileria taurotragi* in South Africa. *Onderstepoort J Vet. Res*, 48, 149-153.
- 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.
- El Imam, A. H., Taha, K. M. (2015). Malignant ovine theileriosis (*Theileria lestoquardi*): a review. *JJBS*, 8(3), 165-174.
- 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>
- 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>
- Habibi, G. (2012). Phylogenetic Analysis of *Theileria annulata* Infected Cell Line S15 Iran Vaccine Strain. *Iran J Parasitol*, 7(2), 73-81.
- Hashemi-Fesharki, R. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia*, 39(2), 115-117.
- Heidarpour Bami, M., Haddadzadeh, H., Kazemi, B., Khazrainia, 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>
- Hooshmand-Rad, P., Hawa, N. (1973). Transmission of *Theileria hirci* in sheep by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Trop Anita Hlth Prod*, 5(2), 103-109.
- 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., Zwegarth, 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](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*. (2nd ed.) Blackwell Sciences Ltd. London, UK.
 24. Neitz, W. (1972). Experimental transmission of *Theileria ovis* by *Rhipicephalus evertsi mimiticus* and *Rhipicephalus 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](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. *Immunobiology*, 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. Telmadarrayi, 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](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., Khazraimnia, 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

**Differential Diagnosis of *Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis* and *Theileria annulata* in Sheep, Using Molecular Method, PCR.**Roohollah Fattahi¹, Parviz Shayan¹, Elahe Ebrahimzadeh², Narges Amininia¹¹Research Center Ticks and Tick-borne Diseases, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

doi 10.22059/jvr.2018.241840.2702

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.