

تشخیص مولکولی تیلریا اکوئی در سگ‌های مناطق روستایی اطراف اهواز

سمیه بهرامی^{۱*}، علیرضا البرزی^۲، بهمن مصلی‌نژاد^۳ و حسن جوانشیری قاسم‌آبادی^۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۲

چکیده

تیلریوز اسبی یکی از بیماری‌های انگلی با اهمیت در بین تک‌سمی‌ها می‌باشد. تشخیص دقیق حاملین این انگل برای پیشگیری از بیماری و اقدامات کنترلی مؤثر، می‌تواند حائز اهمیت باشد. به همین منظور هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی احتمال وجود انگل تیلریا اکوئی در سگ‌های شهرستان اهواز بوده است. در مجموع نمونه‌ی خون ۱۰۰ قلاده سگ به روش مولکولی برای بررسی حضور انگل تیلریا اکوئی بررسی گردید. پس از استخراج DNA از خون کامل سگ‌ها، برای ردیابی DNA انگل تیلریا اکوئی روی نمونه‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد و نتایج آن‌ها با استفاده از ژل آگارز مشاهده گردید. از بین ۱۰۰ نمونه‌ی خون مورد مطالعه تنها در دو مورد آلودگی به انگل تیلریا اکوئی مشاهده گردید. به عبارتی، به نظر می‌رسد که ۲ درصد از سگ‌های مورد مطالعه احتمالاً حامل انگل تیلریا اکوئی بودند. در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که سگ‌های شهرستان اهواز آلوده به انگل تیلریا اکوئی بوده‌اند. بنابراین این حیوانات می‌توانند احتمالاً به عنوان حاملین احتمالی انگل تیلریا اکوئی مطرح باشند. لذا در ارتباط با برنامه‌ریزی جهت کنترل تیلریوز اسبی در میان اسبان، آلودگی سگ‌ها نیز باید در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: تیلریا اکوئی، سگ، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، اهواز

مقدمه

دیگر از مجموع ۱۰۵ رأس اسب شهرستان یزد، ۲۲/۸۶ درصد آن‌ها به روش PCR آلوده به انگل تیلریا اکوئی تشخیص داده شدند (Bahrami et al. 2014a). Abedi و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع ۴۵ درصدی تیلریا اکوئی را در اسبان خراسان شمالی با روش PCR گزارش نمودند. بنابراین در مجموع، مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که تیلریوز اسبی به صورت اندمیک در ایران وجود دارد. با توجه به اهمیت انگل در صنعت اسب‌داری، شناسایی مخازن آن حائز اهمیت می‌باشد. باید در نظر گرفته شود که حیوانات حامل، منابع اصلی برای گسترش عفونت هستند و مهم‌ترین نقش را در تغییر چرخه‌ی زندگی انگل بین اسب و کنه‌ها دارند. تشخیص دقیق حاملین، برای

تیلریا اکوئی یکی از مهم‌ترین انگل‌های خونی در تک‌سمی‌ها می‌باشد و عمدتاً به واسطه‌ی کنه‌ها انتقال می‌یابد. این انگل یکی از عوامل مهم پیروپلاسموز در تک‌سمی‌ها می‌باشد و در حال حاضر به طور عمده در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آفریقا، آمریکا و آسیا وجود دارد (De Waal 1992). این انگل می‌تواند علاوه بر بیماری‌زایی و ایجاد خسارات ناشی از آن، صادرات و واردات اسب‌ها و جابه‌جایی آن‌ها را محدود کند. گزارش‌های مختلفی از شیوع انگل تیلریا اکوئی در ایران در اسب وجود دارد. در مطالعه‌ی Bahrami و همکاران در سال ۲۰۱۴b، ۲۸/۵ درصد اسبان استان خوزستان به انگل تیلریا اکوئی آلوده بوده‌اند. همچنین در مطالعه‌ای

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: s.bahrami@scu.ac.ir

*۱ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۴ دانشجوی دکتری حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

قلاده بودند. از جمعیت کل سگ‌های مورد مطالعه، ۵۹ قلاده از جنس نر و ۴۱ قلاده از جنس ماده بودند. نژادهای مورد بررسی در جمعیت سگ‌های روستایی، عمدتاً شامل نژادهای مخلوط (۸۸ قلاده)، ژرمن شفرد (۹ قلاده) و دوبرمن پینچر (۳ قلاده) بودند. لازم به ذکر است که علایم حیاتی (درجه‌ی حرارت، تنفس و ضربان قلب) حیوانات مورد مطالعه، اخذ شده و سلامت آن‌ها بر اساس تاریخچه و معاینات بالینی معمول، مورد توجه قرار گرفت.

تخلیص DNA ژنومی تیلریا اکویی با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (سیناژن- ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت. برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نیز از پرایمرهای مطالعه‌ی Alhassan و همکاران در سال ۲۰۰۵ که ژن 18S rRNA را تکثیر نموده و قطعه‌ای به طول ۴۳۵ جفت باز تولید می‌کنند، استفاده شد. توالی پرایمرهای پیش رو و معکوس در مطالعه‌ی حاضر به ترتیب 5'-TCGAAGACGATCAGATACCGTCG-3' و 5'-TGCCTTAAACTTCCTTGCGAT-3' بود. در هر واکنش از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA خون اسب آلوده به تیلریوز بالینی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در تکنیک PCR به کار رفته، مقدار مواد مورد نیاز برای هر واکنش، تعداد چرخه و دمای هر مرحله بر اساس چند آزمایش اولیه تعیین گردید. برنامه‌ی PCR ابتدا ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد اجرا شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندها به وسیله‌ی دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده گردید.

نتایج

پس از استخراج DNA از خون سگ‌ها و جستجوی DNA انگل در آن، به روش PCR در ۲ درصد از سگ‌ها

پیش‌گیری از بیماری و اقدامات کنترلی مؤثر، ضروری است. در گسترش خونی رنگ‌آمیزی شده تشخیص مستقیم پیروپلاسموز در گلبول‌های قرمز تنها در فاز حاد عفونت امکان‌پذیر می‌باشد. از آن جایی که در فاز نهفته، تعداد انگل در خون به شدت کم می‌شود، مطالعه‌ی میکروسکوپی در این حالت، روش مناسب تشخیصی نمی‌تواند باشد.

در اوایل ۱۹۹۰، روش‌های مولکولی برای شناسایی DNA تیلریا اکویی در خون معرفی شد (Posnett and Ambrosio 1991). روش‌های مولکولی دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و قادر به شناسایی آلودگی‌های خفیف می‌باشند (Alhassan et al. 2005). با توجه به این که، در تعدادی از مطالعات در سال‌های اخیر به حضور انگل تیلریا اکویی در سگ اشاره شده است (Beck et al. 2010, Fritz 2009)، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی وجود انگل تیلریا اکویی در سگ‌های روستایی اطراف شهر اهواز به روش مولکولی بوده است.

مواد و روش کار

جهت نمونه‌گیری در این مطالعه، که در محدوده زمانی مهر ماه ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴ صورت گرفت، حداقل ۲ سی‌سی خون، از مجموع ۱۰۰ قلاده سگ روستایی در حومه‌ی شهرستان اهواز، از ورید سفالیک یا صافن خارجی آن‌ها اخذ گردید. جهت به دست آوردن نمونه از سگ‌های روستایی (۱۰۰ قلاده)، حاشیه‌ی اهواز به ۴ منطقه‌ی جغرافیایی شمال، جنوب، شرق و غرب تقسیم گردید و از هر منطقه نمونه‌های مورد نظر به دست آمدند. تمامی سگ‌های مورد مطالعه، از نظر بالینی سالم بودند و سگ‌های بیمار از مطالعه خارج می‌شدند. جهت انجام تحقیق، سگ‌های مورد مطالعه در ۳ گروه سنی (کم‌تر از ۱ سال، ۱ تا ۳ سال و بالاتر از ۳ سال) قرار گرفتند. تعداد سگ‌های کم‌تر از ۱ سال، ۲۳ قلاده، تعداد سگ‌های ۱ تا ۳ سال، ۴۶ قلاده و تعداد سگ‌های بالاتر از ۳ سال، ۳۱

همچنین ۱۹ درصد سگ‌ها در مطالعه‌ی ذکر شده آلوده به انگل تیلریا اکوئی بودند و در ۰/۶ درصد آن‌ها آلودگی به بابزیا کابالی مشخص شده بود. نتیجه‌ی نهایی این مطالعه این بود که دام‌ها می‌توانند چندین عامل پیروپلاسم را (چه اختصاصی و چه غیراختصاصی) به طور همزمان دارا باشند. در مطالعه‌ی Beck و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز تیلریا اکوئی و بابزیا کابالی از دو سگ با علائم بالینی پیروپلاسموز جدا گردیده است.

در ارتباط با وجود انگل تیلریا اکوئی در سگ دو نکته قابل توجه می‌باشد. نکته‌ی اول این است که در گذشته پیروپلاسمیدها به عنوان تک یاختگان با میزبان خاص شناخته می‌شدند، اما مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی وقوع گونه‌های غیر معمول پیروپلاسمیدها در میزبان مختلف بوده‌اند و اختصاصی بودن این انگل‌ها را به میزبان مورد سوال و شک قرار داده‌اند (Criado-Fornelio et al. 2003, Bulig et al. 2007, Gimenez et al. 2009, Fritz et al. 2010).

نکته‌ی دوم در رابطه با مخزن بودن سگ برای انگل تیلریا اکوئی توجه به نقش کنه‌ها در گسترش و توسعه‌ی انگل در بین جمعیت‌های مختلف دامی می‌باشد. جنس‌های هیالوما، ریپی سفالوس و درماستور از مهم‌ترین جنس‌های کنه‌ی سخت می‌باشند که آن‌ها را به عنوان ناقلین تیلریا اکوئی معرفی می‌کنند (De Waal 1992). کنه‌های یاد شده از کنه‌هایی هستند که قادر به خونخواری از سگ بوده و آلودگی سگ‌ها به این کنه‌ها گزارش شده است. بنابراین پرورش سگ در تماس نزدیک با اسبان ممکن است به طور غیر منتظره به گسترش پاتوژن در این گونه‌ها کمک کند.

در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که سگ‌های روستایی اطراف اهواز آلوده به انگل تیلریا اکوئی هستند. بنابراین این حیوانات می‌توانند به عنوان حاملین احتمالی انگل تیلریا اکوئی مطرح باشند. لذا در ارتباط با برنامه‌ریزی جهت کنترل تیلریوز اسبی در میان اسبان، آلودگی سگ‌ها نیز باید در نظر گرفته شود.

(۲ نمونه از ۱۰۰ رأس) آلودگی به تیلریا اکوئی مشاهده گردید. موارد مثبت مواردی در نظر گرفته شدند که بانندی در حدود ۴۰۰ جفت باز در الکتروفورز آن‌ها مشاهده شد.

مشخصات سگ‌های آلوده شامل نژاد ژرمن شفرد، بالای ۳ سال (۴ ساله)، جنس نر، سمت جنوب اهواز و دیگری ژرمن شفرد، بین ۱ تا ۳ سال (۲/۵ ساله)، جنس ماده، سمت شرق اهواز بود. در زمان معاینه، سگ‌های مبتلا در بدن کنه نداشتند و در مجاور مستقیم با اسب نبودند و بنابراین احتمالاً آلودگی از قبل بوده است. با توجه به تعداد نمونه‌های مثبت کم، امکان بررسی آماری وجود نداشت.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، ۲ درصد سگ‌های روستایی اطراف اهواز آلوده به انگل تیلریا اکوئی بودند. مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه مبنی بر آلودگی سگ‌ها به انگل تیلریا اکوئی در ایران می‌باشد. در ارتباط با آلودگی سگ‌ها به انگل تیلریا اکوئی در سایر کشورها، گزارش‌های محدودی وجود دارد. برای اولین بار آلودگی سگ‌ها به انگل تیلریا اکوئی توسط Criado-Fornelio و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش گردید. این محققین عدم شناسایی انگل تیلریا اکوئی در سگ تا سال ۲۰۰۳ را به دلیل شباهت‌های مورفولوژیک بسیار زیاد دو انگل تیلریا اکوئی و بابزیا گیسونی به یکدیگر دانسته‌اند. آن‌ها استفاده از روش‌های مولکولی را در تمایز صحیح دو انگل مؤثر دانسته‌اند.

در مطالعه‌ی Fritz در سال ۲۰۱۰ که به منظور شناسایی پیروپلاسماهای سگ و اسب در پاریس انجام شده است، آلودگی سگ‌ها به پیروپلاسماهای اسب و آلودگی اسب‌ها به پیروپلاسماهای سگ مشاهده گردیده است. به طوری که در ۱۰ درصد اسب‌ها آلودگی به بابزیا کنیس کنیس و در ۰/۹ درصد بابزیا کنیس رسی تشخیص داده شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان تحصیلات تکمیلی (پایان‌نامه دکترای عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام میدارند.

منابع

- Abedi, V.; Razmi, G.; Seifi, H. and Naghibi, A. (2014). Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses and ixodid ticks in Iran. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5 (3): 239-244.
- Alhassan, A.; Pumidonming, W.; Okamura, M.; Hirata, H.; Battsetseg, B.; Fujisaki, K. and Igarashi, I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, 129 (1-2): 43-49.
- Bahrami, S.; Ghadrđan, A.R.; Mirabdollahi, S.M. and Fayed, M.R. (2014a). Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Tropical Biomedicine*, 31(1): 110-117.
- Bahrami, S.; Ghadrđan, A.R.; Pourmahdi Borujeni, M. and Vafayi Salarpur, M.V. (2014b). Epidemiology of *Theileria equi* in Persian Arab horses from Iran. *Veterinari Medicina*, 59(9): 409-414.
- Beck, R.; Vojta, L.; Mrjak, V.; Marinculic, A.; Beck, A.; Zivicnjak, T. and Caccio, S.M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal of Parasitology*, 39 (7): 843-848.
- Buling, A.; Criado-Fornelio, A.; Asenzo, G.; Benitez, D.; Barba-Carretero, J. and Florin-Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 147 (1): 16-25.
- Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marcos, A.; Buling-Sarana, A. and Barba-Carretero, J. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. *Epizootiological Aspects. Veterinary Parasitology*, 113(3-4): 189-201.
- de-Waal, D.T. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, 148 (1): 6-14.
- Fritz, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106(6): 1339-1342.
- Gimenez, C.; Casado, N.; Criado-Fornelio, A.; de Miguel, F.A. and Dominguez-Penafiel, G. (2009). A molecular survey of Piroplasmida and Hepatozoon isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). *Veterinary Parasitology*, 162(1): 147-150.
- Posnett, E.S. and Ambrosio, R. (1991). DNA probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitology*, 102 (03): 357-365.

Molecular detection of *Theileria equi* in dogs from rural areas around Ahvaz

Bahrami, S.¹; Alborzi, A.R.¹; Mosallanejad, B.² and Javanshiri Ghasem Abadi, H.³

Received: 04.05.2016

Accepted: 11.01.2017

Abstract

Equine theileriosis is one of the most important parasitic diseases among the equids that poses a serious threat to the horse industry. Proper diagnosis of parasites in carriers is important for prevention and effective control measures. Therefore, the aim of the present study was to investigate the probable presence of *Theileria equi* infection in dogs from Ahvaz city. A total of 100 blood samples from dogs were examined for the presence of *T. equi* infection using molecular methods. After DNA extraction from the dog's whole blood, for tracking DNA of *T. equi* polymerase chain reaction was performed and the results were observed in agarose gel. Out of 100 samples, the PCR method detected *T. equi* infection in two dogs. In other words, two percent of dogs were probably carriers for *T. equi*. In conclusion, the present study revealed that dogs from Ahvaz city are infected with *T. equi*. So these animals can be probably considered as the carriers of *T. equi*. Therefore, we should pay attention to dog's with *T. equi* infection in equine theileriosis control programs.

Key words: *Theileria equi*, Dog, Polymerase Chain Reaction, Ahvaz

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Bahrami, S., E-mail: s.bahrami@scu.ac.ir