طراحی و به کارگیری تکنیک Semi-Nested PCR برای شناسایی *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* در گاو

قائمی، پ.*[۱]، شایان، پ.[۲]، حقوقی راد، ن.[۳]، اکرت، ب.[۲].

دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۹/۱۶

خلاصه

بیماری تیلریوز ناشی از *تیلریا آنولاتا*، یکی از بیماری های مهم و خطرناک برخی کشورهای مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری است که همه ساله در این مناطق و بویژه ایران، خسارات اقتصادی زیادی را در دامداری های صنعتی ایجاد می نماید. تاکنون گونهٔ *تیلریا آنولاتا* با روش های مورفولوژی، سرولوژی و مولکولی از گاوهای ایران گزارش شده است، در حالی که گونهٔ *تیلریا اورینتالیس* که به نظر می رسد گونهٔ غیر پاتوژنی باشد، فقط با روش های مورفولوژی و سرولوژی از گاوهای ایران گزارش شده است. در روش ارائه شده این مطالعه، برای اولین بار در ایران امکان جداسازی جنس های *تیلریا* و *بابزیا* و نیز گونه های *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* از یکدیگر با استفاده از تکنیک های PCR و Semi-Nested PCR به کمک پرایمرهای طراحی شده Bba-S، Bba-A، Tbs-S، Tbs-A، To-S و Ta-S فراهم شده است.

واژه های کلیدی: تشخیص، *تیلریا آنولاتا*، *تیلریا اورینتالیس*، Semi-Nested PCR ،گاو

---

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران.

۲. مؤسسه پژوهشی انتقال سامانه های بیولوژی مولکولی (MBST)، تهران، ایران.

۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤول: vetiran@gmail.com

مقدمه

تیلریا آنولاتا عامل تیلریوز مدیترانه ای در شمال آفریقا، جنوب اروپا، هندوستان، چین، خاورمیانه، بویژه ایران، خسارات اقتصادی فراوانی ایجاد می کند (Ahmed و همکاران، ۲۰۰۲؛ Barnett، ۱۹۷۴؛ Mehelhorn و Schein، ۱۹۸۴). گونه های تیلریای گاوی تک یاخته های داخل سلولی انتقال یافته توسط کنه ها هستند که قادرند عفونت های شدید یا خفیفی را در میزبان های خود ایجاد کنند (Uilenberg، ۱۹۸۱). تیلریاها عمدتاً توسط کنه های ایکسودیده منتقل می شوند و در فصول گرم، که فصل فعالیت کنه هاست، شیوع بیشتری دارند (سخا و همکاران، ۱۳۸۰). دو گونه از تیلریاها شامل *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا پاروا* در گاو به ترتیب موجب ایجاد بیماری تیلریوز گرمسیری و بیماری تب ساحل شرقی می شوند (Uilenberg، ۱۹۸۱). پراکندگی *تیلریا* پاروا به مناطق شرق، مرکز و جنوب آفریقا محدود است، در صورتی که *تیلریا آنولاتا* انتشار بسیار گسترده تری دارد (Brown، ۱۹۹۰). *تیلریا سرجنتی/ بوفلی/ اورینتالیس*، موجب ایجاد بیماری خفیف یا بدون نشانه در گاو می شود که تحت عنوان تیلریوز خوش خیم در گاو شناخته می شوند (Uilenberg، ۱۹۸۱). انگل های عامل تیلریوز خوش خیم در سراسر جهان پراکندگی دارند (Savini و همکاران، ۱۹۹۸). تشخیص دقیق به همراه حساسیت فوق العاده در شناسایی حاملان فاقد نشانه های مشخص بیماری، یکی از اهداف مهم بررسی های اپیدمیولوژیک محسوب می شود؛ لذا در بین روش های تشخیصی با حساسیت قابل قبول، روش PCR با حساسیت و ویژگی بالایی همراه بوده، به طوری که قابلیت تشخیص یک سلول آلوده را نیز دارد (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۴). تاکنون دو گونه *تیلریا آنولاتا* (با روش های مورفولوژی، سرولوژی و مولکولی) و *تیلریا اورینتالیس* (با روش های مورفولوژی و سرولوژی) در گاوهای ایران گزارش شده اند (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۴؛ سخا و همکاران، ۱۳۸۰؛ Azizi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Uilenberg و Hashemi-Fesharaki، ۱۹۸۴). هدف از مطالعهٔ حاضر، طرح ریزی و به کارگیری یک روش مولکولی جدید و مؤثر به منظور جداسازی جنس های تیلریا و بابزیا و نیز تمایز بین گونه های *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* از یکدیگر با حساسیت و ویژگی بالاست.

مواد و روش ها:

۱.جمع آوری و نگهداری نمونه خون:

برای انجام این پژوهش، نمونه برداری از ۵۰ رأس گاو به ظاهر سالم (به صورت پایلوت) صورت پذیرفت؛ بدین منظور پس از مقیدکردن گاوها، از هر یک از آنها ۵ میلی لیتر خون از ورید زیر دم با استفاده از لوله ونوجکت گرفته شد. سپس با اضافه کردن هم حجم آن از الکل اتانول خالص مرک به آرامی آن را تکان داده تا خون به طور کامل لخته شود. سپس همهٔ مشخصات گاو اعم از سن، جنس، نژاد، منطقه، نام صاحب دام و تاریخ نمونه برداری و سایر اطلاعات مورد لزوم برای هر نمونه ثبت و کد مربوط به آن، بر روی نمونه نیز درج شد و به آزمایشگاه مؤسسه پژوهشی انتقال سامانه های بیولوژی مولکولی (MBST) مستقر در مرکز رشد زیست فناوری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک ارسال گردید.

۲.طراحی پرایمرها:

گام اول در انجام آزمایش PCR طراحی پرایمرهای مناسب جهت تکثیر ژن مورد نظر است. در طراحی پرایمرهای این پژوهش از برنامهٔ Bio Edit استفاده شد. جایگاه مورد شناسایی پرایمرهای داخلی و خارجی طراحی شده در این پژوهش بر روی توالی ژن 18S rRNA *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس* در تصویر ۱ و نام و مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

۳.استخراج DNA از خون:

ابتدا مقداری از خون لخته شده درون اتانول خالص مرک با استفاده از سر سمپلر استریل برداشته و در یک تیوب اپندورف استریل ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد تا در دمای آزمایشگاه کاملاً خشک و عاری از الکل شود. سپس کار استخراج DNA با استفاده از کیت مخصوص (DNA Extraction Kit, MBST, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازندهٔ آن به ترتیب زیر صورت گرفت:

۳-۱) ۱۸۰ میکرولیتر محلول لیز کننده (Lysis Buffer) به نمونه افزوده و بلافاصله مخلوط شد.

۳-۲) ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (K Proteinase) به نمونهٔ فوق افزوده و بعد از مخلوط کردن به وسیله ورتکس (Vortex)،

به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در صورتی که طی ۱۰ دقیقه نمونه به طور کامل حل نشده بود، مدت زمان نگهداری در ۵۵ درجه سانتیگراد افزایش داده می شود تا نهایتاً محلول کاملاً یکدست و شفافی حاصل شود.

۳-۳) ۳۶۰ میکرولیتر محلول پیوندی (Binding Buffer) به محلول فوق افزوده و بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳-۴) ۲۷۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به محلول فوق افزوده و ورتکس شد.

۳-۵) یک ستون فیلتردار مخصوص کیت را روی یک تیوب اپندورف استریل ۱/۵ میلی لیتری قرار داده و همهٔ محلول مرحلهٔ ۴ به داخل آن منتقل شد. ستون همراه با تیوب فوق با دور xg ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ستون را روی یک تیوب جدید قرار داده و تیوب قبل همراه با مایع داخل آن دور ریخته شد.

۳-۶) ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشو دهنده (Wash Buffer) به داخل ستون ریخته، با دور xg ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شده و بعد مانند مرحله قبل، تیوب مصرفی با یک تیوب جدید استریل تعویض شد.

۳-۷) مرحلهٔ ۶ مجدداً تکرار شد.

۳-۸) برای جداسازی باقیماندهٔ الکل در ستون، ستون بدون افزودن هیچ محلولی با دور xg ۱۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و تیوب زیر آن تعویض شد. بدین ترتیب الکل متصل به دیواره ستون به طور کامل حذف شد.

۳-۹) ۵۰ میکرولیتر از محلول حلال (Elution Buffer) که تا ۷۰ درجه سانتی گراد گرم شده به ستون افزوده و بعد از ۳ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، با دور xg ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید.

۳-۱۰) بدون تعویض تیوب، مرحلهٔ قبل تکرار شد.

۳-۱۱) ستون دور ریخته شد. محلول داخل تیوب حاوی DNA استخراجی از هر نمونه و به حجم تقریبی ۱۰۰ میکرولیتر بوده که با نصب مشخصات کامل روی لوله، در ۲۰ درجه سانتیگراد جهت اقدامات بعدی نگهداری شد.

٤. ارزیابی DNA استخراج شده:

جهت ارزیابی میزان DNA استخراج شده، DNA استخراج شده از هر نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتررورفورز شد و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی قابلیت انجام PCR روی DNA استخراج شده، هر یک از آنها با پرایمرهای اختصاصی مشتق شده از ژن کدکنندهٔ بتا اکتین گاو مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۱-۴) آنالیز DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده از الکتروفورز مستقیم:

بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده (Loading Buffer) مخلوط شده، سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از تانک الکتروفورز (MBST) حاوی بافر ۰/۵x TBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعهٔ UV، باندهای جدا شده قابل رؤیت شدند. باندهای ایجاد شده در این مرحله به علت سنگین بودن DNA های استخراج شده، اندکی پایین تر از چاهک ها مشاهده شدند؛ دیده شدن باندها در این مرحله، انجام صحیح مراحل استخراج DNA را تأیید نمود.

۲-۴) آنالیز DNA استخراج شده از خون گاو با استفاده از روش PCR:

در ابتدا برای اطمینان از استخراج صحیح DNA، بر روی هر نمونه یک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bba-S و Bba-A منشعب از ژن کدکنندهٔ پروتئین بتا اکتین گاو انجام گرفت. بدین منظور در داخل هر تیوب ۰/۲ میلی لیتری اختصاصی PCR، ۲ میکرولیتر DNA ریخته شد. به هر یک از نمونه های DNA نیز میزان ۱۰ میکرولیتر PCR Buffer ۲،۱۰x میکرولیتر(10mM each) dNTP، ۳ میکرولیتر(50mM) Mgcl2 ، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (5U/µl)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر Bba-S (20µM) و Bba-A (20µM) و آب دوبار تقطیر استریل به اندازه ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باشد، اضافه شد و در دستگاه ترموسیکلر(Termal Cycler, MWG, Germany) با برنامهٔ زیر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت:

۱-۲-٤) برنامهٔ دستگاه ترموسیکلر:

۱-۱-۲-۴) مرحلهٔ اول: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد: واسرشت (Denaturation)

۲-۱-۲-۴) مرحلهٔ دوم: شامل

الف. ۲ سیکل {۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد: واسرشت (Denaturation)، ۹۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو (Annealing)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت (Extention)}

ب. ۲ سیکل {۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد: واسرشت (Denaturation)،۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو (Annealing)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت (Extention)}

پ.۳۴ سیکل {۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد: واسرشت (Denaturation)، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد: اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در رشته الگو (Annealing)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد: طویل شدن پرایمرها یا زمان ساخت (Extention)}

۳-۱-۲-۴) مرحلهٔ سوم: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد: زمان ساخت تکمیلی (Extention)

۲-۲-۴) بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده مخلوط شده، سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از تانک الکتروفورز حاوی بافرTBE ۰/۵x با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV، باندهای جدا شده قابل رؤیت گردیدند. اندازهٔ محصول PCR در این مرحله، ۶۳۹ جفت باز بود.

۵. تفریق انگل های *تیلریا* و *بابزیا* در خون با استفاده از روش PCR:

بدین منظور بر روی هر نمونه یک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب از ژن کدکننده 18S rRNA انجام گرفت. بدین منظور در داخل هر تیوب ۰/۲ میلی لیتری اختصاصی PCR، ۲ میکرولیتر DNA ریخته شد. به هر یک از نمونه های DNA نیز میزان ۱۰ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM each)، ۳ میکرولیتر Mgcl2 (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (5U/µl)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر Tbs-S (20µM) وTbs-A (20µM) و آب دوبار تقطیر استریل به اندازه¬ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باشد، اضافه شد و در دستگاه ترموسیکلر با برنامه زیر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت:

۱-۵) برنامه دستگاه ترموسیکلر:

۱-۱-۵) مرحلهٔ اول: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد

۲-۱-۵) مرحلهٔ دوم: شامل

الف. ۲ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

ب. ۲ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

پ. ۳۴ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

۳-۱-۵) مرحلهٔ سوم: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد

۲-۵) بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده مخلوط شد، سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از تانک الکتروفورز حاوی بافر 0/5x TBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV، باندهای جدا شده قابل رؤیت گردیدند. اندازهٔ محصول PCR در همه گونه های بابزیا بین ۴۰۰-۳۸۰ جفت باز بود، در صورتی که در تیلریا سنگین تر و ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز بود.

۶. خالص سازی محصول PCR:

جهت انجام آزمایش Semi-Nested PCR، محصول PCR هایی که در مرحلهٔ قبل مثبت شده بودند با استفاده از

کیت تخلیص محصول PCR (PCR Purification Kit, MBST, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده و به شرح ذیل خالص شدند:

۶-۱) در ابتدا حجم محصول PCR با آب مقطر دو بار استریل به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

۶-۲) سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول پیوندی به ۱۰۰ میکرولیتر محصول PCR اولیه افزوده شده، بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی¬گراد قرار داده شد.

۶-۳) ۱۵۰ میکرولیتر اتانول خالص مرک به محلول فوق افزوده و ورتکس شد.

۶-۴) یک ستون فیلتردار روی یک تیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده و کل محلول مرحلهٔ ۲ به آن منتقل شد. ستون همراه با تیوب با دور xg ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شده، سپس ستون را روی یک تیوب استریل جدید قرار داده و تیوب قبلی همراه با مایع داخلی آن دور ریخته شد.

۶-۵) ۵۰۰ میکرولیتر محلول شستشو به داخل ستون ریخته و با دور xg ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد و بعد مانند مرحله قبل تیوب مصرفی با یک تیوب جدید تعویض شد.

۶-۶) برای جداسازی باقیماندهٔ الکل در ستون، بدون افزودن هیچ محلولی با دور xg ۱۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد و تیوب زیر آن تعویض گردید.

۶-۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول حلال که تا دمای ۷۰ درجه سانتی گراد گرم شده بود به ستون افزوده و بعد از ۳ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، با دور xg ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد.

۶-۸) ستون ها دور ریخته شد و محلول داخل تیوب که شامل DNA تمیز و خالص شده حاصل از محصول PCR بود در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا جهت انجام Semi-Nested PCR در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

۷. بررسی حضور انگل تیلریا آنولاتا با استفاده از روش Semi-Nested PCR:

بدین منظور محصول تمامی نمونه هایی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب از ژن کدکننده 18S rRNA مثبت شده بود، ابتدا با استفاده از کیت مخصوص خالص سازی محصول PCR، تخلیص و سپس با پرایمرهای اختصاصی Ta-S و Tbs-A منشعب از ژن کد کننده 18S rRNA تحت آزمایش Semi-Nested PCR قرار گرفتند. بدین منظور در داخل هر تیوب ۰/۲ میلی لیتری اختصاصی PCR، ۲ میکرولیتر محصول PCR تخلیص شده ریخته شد. به هر یک از نمونه های DNA نیز میزان ۱۰ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM each)، ۳ میکرولیتر Mgcl2 (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (5U/µl)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر Ta-S (20µM) و Tbs-A (20µM) و آب دوبار تقطیر استریل به اندازه ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باشد، اضافه شد و در دستگاه ترموسیکلر با برنامهٔ زیر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت.

۷-۱) برنامهٔ دستگاه ترموسیکلر:

۷-۱-۱) مرحلهٔ اول: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد

۷-۱-۲) مرحلهٔ دوم: شامل

الف. ۲ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

ب. ۳۵ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

۷-۱-۳) مرحلهٔ سوم: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد

۷-۲) بررسی محصول Semi-Nested PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

۱۰ میکرولیتر از محصول Semi-Nested PCR با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده مخلوط شد، سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از تانک الکتروفورز (MBST) حاوی بافر ۰/5xTBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV، باندهای جدا شده قابل رؤیت گردیدند. اندازهٔ محصول PCR در این مرحله، ۱۹۳ جفت باز بود.

۸. بررسی حضور انگل *تیلریا اورینتالیس* با استفاده از روش Semi-Nested PCR:

بدین منظور محصول تمامی نمونه هایی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A منشعب

از ژن کدکننده 18S rRNA مثبت شده بود، ابتدا با استفاده از کیت مخصوص خالص سازی محصول ، تخلیص و سپس با پرایمرهای اختصاصی To-S و Tbs-A منشعب از ژن کدکننده 18S rRNA تحت آزمایش Semi-Nested PCR قرار گرفتند. بدین منظور در داخل هر تیوب ۰/۲ میلی لیتری اختصاصی PCR، ۲ میکرولیتر محصول PCR تخلیص شده ریخته می شد. به هر یک از نمونه های DNA نیز میزان ۱۰ میکرولیتر PCR 10x Buffer، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM each)، ۳ میکرولیتر Mgcl2 (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (5U/µl)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر To-S (20µM) و Tbs-A (20µM) و آب دوبار تقطیر استریل به اندازه ای که حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر باشد اضافه شد و در دستگاه ترموسیکلر با برنامهٔ زیر تکثیر مکرر DNA انجام گرفت:

۸-۱) برنامهٔ دستگاه ترموسیکلر:

۸-۱-۱) مرحلهٔ اول: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد

۸-۱-۲) مرحلهٔ دوم: شامل

الف. ۲ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه در ۴۸ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

ب. ۳۵ سیکل (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۴۸ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد)

۸-۱-۳) مرحلهٔ سوم: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد

۸-۲) بررسی محصول Semi-Nested PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز:

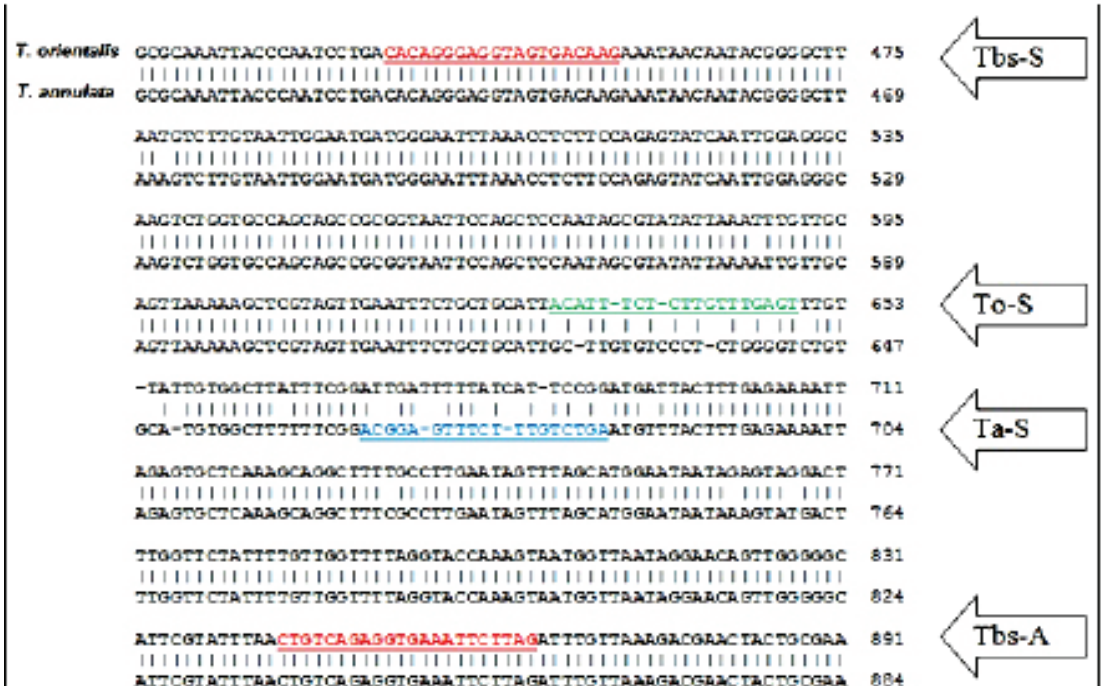
۱۰ میکرولیتر از محصول Semi-Nested PCR با ۴ میکرولیتر محلول سنگین کننده مخلوط شد، سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از تانک الکتروفورز (MBST) حاوی بافر 0/5x TBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز و جداسازی انجام گرفت. در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و با استفاده از اشعه UV، باندهای جدا شده قابل رؤیت گردیدند. اندازهٔ محصول PCR در این مرحله، ۲۳۵ جفت باز بود.

نام پرایمر	ژن	توالی نوکلئوتید ها (۵'-۳')	ویژگی پرایمر
Bba-S	Bovine β-Actin	CCT-AGA-GAG-AAG-CGG-GGT-G-<G>	For PCR amplification of Bovine β-Actin encoding gene
Bba-A	Bovine β-Actin	ATC-ACT-GCC-CTG-GCA-CCC-A-<G>	For PCR amplification of Bovine β-Actin encoding gene
Tbs-S	18S rRNA	CAC-AGG-GAG-GTA-GTG-ACA-AG	Specific for Theileria sp. and Babesia sp.
Tbs-A	18S rRNA	CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA-G	Specific for Theileria sp. and Babesia sp.
Ta-S	18S rRNA	ACG-GAG-TTT-CTT-TGT-CTG-<A>	Specific for Theileria anuulata
To-S	18S rRNA	ACA-TTT-CTC-TTG-TTT-GAG-<T>	Specific for Theileria orientalis

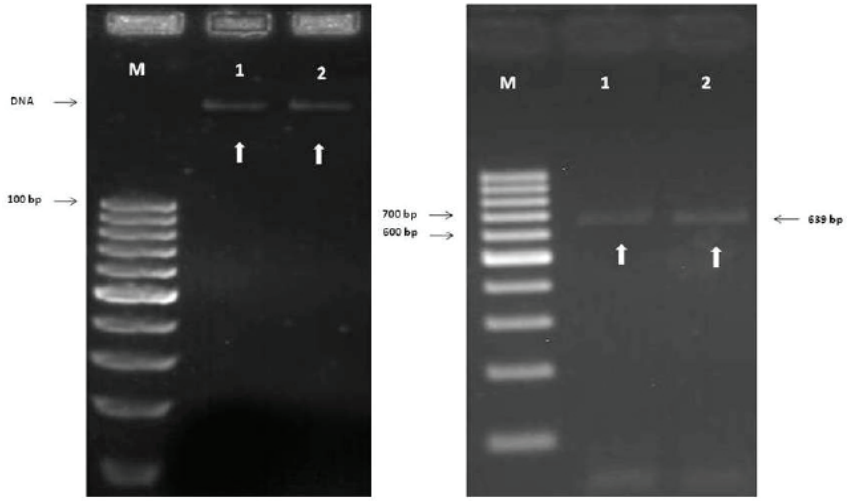
جدول ۱. نام و مشخصات پرایمرها

نتایج:

نتایج ارزیابی کیفی و کمی DNA های استخراج شده در این پژوهش با مشاهدهٔ باندهای ایجاد شده در ژل آگارز پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده زیر نور UV تأیید گردید. (تصویر ۲) باندهای حاصل از الکتروفورز مستقیم DNAهای استخراج شده به علت سنگین بودن، اندکی پایین تر از چاهک ها دیده می شوند (تصویر ۲-۱). باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bba-S و Bba-A دارای ۶۳۹ جفت باز است. (تصویر ۲-۲) باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A در همهٔ گونه های بابزیا بین ۴۰۰-۳۸۰ جفت باز است، درصورتی که در تیلریا سنگین تر و ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز است (تصویر ۳-۱). باند حاصل از الکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با پرایمرهای اختصاصی Ta-S و Tbs-A دارای ۱۹۳ جفت باز است (تصویر ۳-۲). باند حاصل از الکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با پرایمرهای اختصاصی To-S و Tbs-A، ۲۳۵ جفت باز دارد (تصویر ۳-۳).



تصویر ۱: جایگاه مورد شناسایی پرایمرهای داخلی و خارجی طراحی شده در این پژوهش بر روی توالی ژن 18S rRNA *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس*

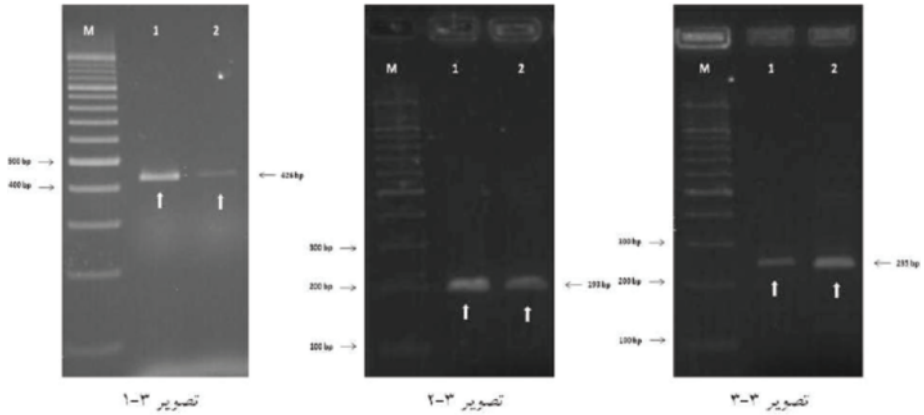


تصویر ۲-۱ تصویر ۲-۲

تصویر ۲: نتایج الکتروفورز DNAهای استخراج شده به منظور ارزیابی کیفیت و کمیت (۱ و ۲: باند حاصل از موارد مثبت- M: مارکر)

تصویر ۲-۱: باندهای حاصل از الکتروفورز مستقیم DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

تصویر ۲-۲: باندهای حاصل ازالکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bba-S و Bba-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید



تصویر ۳-۱ تصویر ۳-۲ تصویر ۳-۳

تصویر ۳: نتایج الکتروفورز محصول PCR و Semi-Nested PCR با پرایمرهای اختصاصی بر روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ و ۲: باند حاصل از موارد مثبت- M: مارکر)

تصویر ۳-۱: باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

تصویر ۳-۲: باندهای حاصل از الکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Ta-S و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

تصویر ۳-۳: باندهای حاصل از الکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی To-S و Tbs-A با بر روی ژل آگارز ۲ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

بحث:

تیلریوز، یکی از مهمترین و خطرناک ترین بیماری های تک یاخته ای دامی در مناطق گرمسیری جهان ازجمله ایران است که سلامتی گاوها و به دنبال آن تولیدات دامی را به مخاطره می اندازد و سالانه خسارات زیادی را به صنعت دامپروری کشور وارد می آورد (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۴؛ سخا و همکاران، ۱۳۸۰). طبق گزارش های موجود، تاکنون دو گونه تیلریا از گاوهای ایران گزارش شده است که توسط کنه ها به گاو منتقل می شوند:

۱-*تیلریا آنولاتا*: این تک یاخته از سال ۱۳۱۴ در ایران مطرح بوده (مظفری و همکاران، ۱۳۸۶) و عامل اصلی بیماری تیلریوز گاوی در ایران است (هاشمی فشارکی، ۱۳۶۵). این تک یاخته می تواند سالانه خسارات زیادی را به صنعت دامپروری کشور وارد سازد و قادر است بیماری حاد و کشنده ای در گاوها ایجاد کند. در نواحی که بیماری به صورت اندمیک درآمده است، آلودگی شدید بیشتر در نژادهای خالص و دورگ دیده می شود و گاوهای بومی از مقاومت بیشتری در برابر آن برخوردارند. کنهٔ ناقل این تک یاخته نیز در اکثر نقاط ایران از گونه های کنه هیالوما می باشد (سخا و همکاران، ۱۳۸۰).

۲-*تیلریا اورینتالیس*: یکی از گونه های خوش خیم *تیلریا* است که در ایران برای اولین بار توسط یولینبرگ و هاشمی فشارکی، از گاوهای شمال کشور و با روش IFAT گزارش شد. آنها نشان دادند که این تک یاخته می تواند به صورت مرحله به مرحله توسط کنهٔ همافیزالیس پونکتاتا انتقال یابد (Uilenberg و Hashemi-Fesharaki، ۱۹۸۴). لازم به ذکر است بجز گزارش یولینبرگ و هاشمی فشارکی، گزارش دیگری از حضور تک یاخته *تیلریا اورینتالیس* در ایران وجود ندارد؛ اما با استفاده از روش طراحی شده در این تحقیق، برای اولین بار با تکنیک مولکولی semi-nested PCR، *تیلریا اورینتالیس* از گاوهای بومی استان گلستان جداسازی گردید (قائمی، ۱۳۸۹).

تاکنون مطالعات متعددی بر روی تیلریاها با روش های تشخیصی متفاوت در ایران و جهان، صورت پذیرفته است که می توان به روش تهیهٔ گسترش خونی و رنگ آمیزی با گیمسا، روش های سرولوژی و نیز روش های مولکولی در سالهای اخیر اشاره کرد. در چندین مطالعه حساسیت و ویژگی بالاتر روش های مولکولی نسبت به روش گیمسا و روش های سرولوژی نشان داده شده است: در یک مطالعه، ۵۰ نمونه خون اخذ شده از گاوهای بومی با روش های PCR و گیمسا از نظر انگل *تیلریا آنولاتا* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این بررسی ۲۲ نمونه را با روش PCR مثبت نشان داد. این در حالی بود که با روش گیمسا، تنها ۸ نمونه مثبت تعیین گردید (Roy و همکاران، ۲۰۰۲). محققان دیگری ۹۲ نمونه خون اخذ شده از گاوهای اسپانیا را از نظر آلودگی به انگل *تیلریا آنولاتا* با روش های تشخیصی PCR، IFA و اسمیر بررسی کردند. در نتایج حاصل از این بررسی، میزان آلودگی متفاوت بوده است. به طوری که میزان آلودگی با روش های PCR، IFA و اسمیر به ترتیب ۷۰، ۴۰ و ۲۲ درصد تعیین شد. در این مطالعه نیز حساسیت بالاتر تکنیک های بر پایه PCR بوضوح مشخص است (d'Oliveira و همکاران، ۱۹۹۵). در بررسی دیگری در شرق ترکیه، تست های تشخیصی PCR، IFA و گسترش خونی برای شناسایی *تیلریا آنولاتا* بر روی ۱۱۰ گاو انجام شده و نتایج مثبت حاصل از آزمون ها به ترتیب ۳۰، ۲۹/۱ و ۱۶/۱ درصد بوده است (Aktas و همکاران، ۲۰۰۲). محققان در مطالعه ای در ایران، ۱۴۰ نمونه خون تهیه شده از گاوهای بومی را با روش های PCR و میکروسکوپی از نظر آلودگی به انگل *تیلریا آنولاتا* بررسی کردند. در این بررسی نیز بین نتایج روش میکروسکوپی و روش PCR اختلاف وجود داشت، به طوری که نرخ حاملان انگل *تیلریا آنولاتا* به ترتیب ۸/۱ درصد و ۴۰ درصد تعیین گردید (Azizi و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه ای که بر روی گاو و بوفالوی آبی در مصر انجام شد، شیوع آلودگی به انگل *تیلریا* با روش گیمسا ۳۰ (۹ مورد از ۳۰ نمونه) درصد عنوان شد. این محققان در ادامهٔ مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که تکنیک PCR حساسیت بالاتری نسبت به روش گیمسا دارد، به طوری که توانسته است ۸۰ درصد موارد مثبت (۲۱ مورد از ۳۰ نمونه) را مثبت ارزیابی کند (Mahmood و همکاران، ۲۰۱۰). مطابق با نظر سایر محققان، اگرچه روش گیمسا یک تکنیک ساده و سریع در تشخیص تیلریوز گاوی در فرم حاد و همراه با علائم آن است، اما این روش برای تعیین مخازن این انگل و نیز در فرم مزمن این آلودگی مناسب نیست و روش های سرولوژی نیز نسبت به روش های مولکولی از حساسیت و ویژگی پایین تری برخوردار است؛ بنابراین با استفاده از روش مولکولی ارائه شده در این مطالعه، علاوه بر امکان شناسایی موارد آلودگی به تیلریاها و بابزیاها و نیز امکان تمایز بین موارد آلودگی با *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا اورینتالیس*، شناسایی مخازن گاوی این آلودگی ها نیز در نقاط مختلف کشور امکانپذیر بوده و علاوه بر مطالعات اپیدمیولوژیکی، در برنامه های غربالگری نیز می تواند به نحو مؤثری مورد استفاده قرار گیرد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 3 (2011) 91-102

Design and Usage of Semi-Nested PCR Technique for Detection of *Theielria annulata* and *Theileria orientalis* in Cattle

Ghaemi, P.[1*], Shayan, P.[2], Hoghooghi-Rad, N.[3], Eckert, B.[2]

Received: 14.03.2011 Accepted: 07.12.2011

Abstract

Tropical Theileriosis, due to *Theileria annulata*, is one of the major diseases of cattle in some tropical and sub-tropical countries that give rise to some serious economic losses in livestock industries in the involved countries such as Iran, every year. So far, *Theileria annulata* was identified by morphological, serological and molecular procedures in cattle of Iran. However, *Theileria orientalis*, which seems to be non-pathogenic, was only detected by morphological and serological methods in the cattle of Iran. Therefore, in the present investigation, for the first time in Iran we were able to differentiate two genus of *Theielria* and *Babesia* and also two species of *Theielria annulata* and *Theileria orientalis* by PCR and semi-nested PCR technique with designing primers of Bba-S, Bba-A, Tbs-S, Tbs-A, To-S and Ta-S.

Key words: *Theileria annulata, Theileria orientalis*, Semi-Nested PCR, Cattle

1. Department of Laboratory Science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

2. Investigating Institute " Molecular Biological System Transfer (MBST) ", Tehran, Iran.

3. Department of Parasitology and Mycology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: vetiran@gmail.com

منابع

سخا، م.؛ رادفر، م.؛ جانباز، م. ۱۳۸۰. مطالعه و بررسی گاوهای مبتلا به تیلریوز ارجاعی به درمانگاه اداره دامپزشکی گناباد طی نیمسال اول ۱۳۷۷، مجلهٔ تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، **۲(۲)**، ۱۸۷- ۱۹۲.

حبیبی، غ.؛ هاشمی فشارکی، ر.؛ اسماعیل نیا، ک.؛ بزرگی، ص.؛ بردبار، ن. ۱۳۸۴. مقایسه دو روش IFAT و PCR در تشخیص و شناسایی تک یاخته های *Babesia bovis*، *Theileria annulata* و *Theileria lestoquardi*، چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، ۴.

قائمی، پ. ۱۳۸۹. تعیین میزان آلودگی به انگل *تیلریا آنولاتا* در گاوهای مخزن و کنه های ناقل در دامداری های سنتی استان گلستان، پایان نامه دورهٔ دکترای تخصصی انگل شناسی و بیماری های انگلی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

مظفری، ع.؛ نور اللهی فر، س.؛ محمدی، و. ۱۳۸۶. بررسی فراوانی تیلریوز گاوی در گاوداری های شهرستان زاهدان، مجلهٔ دامپزشکی ایران، دانشگاه شهید چمران اهواز، **۳ (۳)**، ۶۷- ۷۰.

هاشمی فشارکی، ر. ۱۳۶۵. تیلریوز گاوی در ایران، چاپ اول، انتشارات مؤسسه رازی، صفحه ۳-۸۵

Ahmed, J., Yin, H., Schnittger L., Jongejan, F. 2002. Ticks and tickborne diseases in Asia with special emphasis on China. Parasitology Research. **88**, 51–55

Aktas, M., Dumanli, N., Cetinkaya, B., Cakmak, A. 2002. Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey, Veterinary Record. **150(17)**, 548-549

Azizi, H., Shiran, B., Farzaneh-Dehkordi, A., Salehi, F., Taghadosi, C. 2008. Detection of *Theileria annulata* by PCR and its comparision with smear method in native carrier cows. Biotechnology. **7(3)**, 574-577.

Barnett, S.F. 1974a. Economical aspects of protozoal tick-borne diseases in livestock in parts of the world other than Britain. Bulletin Office International des Epizooties **81(1–2)**, 183–196

Barnett, S.F. 1974b. Economical aspects of tick-borne disease control in Britain. Bulletin Office International des Epizooties. **81(1–2)**, 167–182

Brown, C.G.D. 1990. Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection). Parasitologia. **32**, 23–31

d'Oliveira, C., van der Weide, M., Habela, M., Jacquiet, P., Jongejan, F. 1995. Detetion of *Theileria annulata* in blood samples of carrier Cattle by PCR. Journal of Clinical Microbiology. **33(10)** 2665-2669

Mahmmod, Y. S., El-Balkemy, F. A., Yuan, Z. G., El-Mekkawy, M. F., Monazie, A. M., Zhu, X. Q. 2010. Field Evaluation of PCR Assays for the Diagnosis of Tropical Theileriosis in Cattle and Water Buffaloes in Egypt. Journal of Animal and Veterinary Advances. **9(4)**, 696-699

Mehelhorn, H., Schein E. 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. Advances in Parasitology. **23,** 37–103

Roy, K.C., Ray, D., Bansal, G.C., Singh, R.K. 2000. Detection of Theileria annulata carrier cattle by PCR. Indian Journal of Experimental Biology. **38(3)**, 283–284

Savini, G., Onuma, M., Scaramozzino, P., Kakuda, T., Semproni, G., Langella, V. 1998. First report of Theileria sergenti and T. *buffeli / orientalis* in cattle in Italy. Annals of the New York Academy of Sciences. **849**, 404–407

Uilenberg, G., 1981. Theileria species of domestic livestock. In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (eds) Advances in the control of theileriosis, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Netherlands. 4-37
Uilenberg, G., Hashemi-Fesharaki, R., 1984. *Theileria orientalis* in Iran, The Veterinary Quarterly, **6(1)**, 1-4