

مطالعه فیلوژنی جدایه‌های *Theileria annulata* از استان البرز با استفاده از توالی ژن‌های 18S rRNA و ITS1-2

• اصغر افشاری

کارشناس ارشد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• غلامرضا حبیبی (نویسنده مسئول)

استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• کسری اسماعیل نیا

استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• پرویز شایان

استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۳

Email: g.habibi@rvsri.ac.ir

چکیده

تیلریوز گرمسیری بیماری انگلی ناشی از تک یاخته *T.annulata* بوده و بوسیله کنه‌های جنس هیالوما منتقل می‌شود. تشخیص بیماری معمولاً با مشاهده انگل در گسترش‌های خون محیطی، طحال و غدد لنفاوی صورت می‌گیرد. امروزه روش‌های ملکولی با حساسیت و ویژگی بالایی به منظور تشخیص و شناسایی عامل بیماری در دام‌های مبتلا و ناقل، مطالعات همه‌گیری شناسی و بررسی‌های فیلوژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به حضور تیلریوز گاوی در کشور، مطالعه فیلوژنی *T.annulata* با استفاده از بررسی توالی ژن 18S rRNA و نواحی ITS شامل (ITS1, ITS2, 5.8S rRNA) مربوط به دو جدایه استان البرز به همراه رده سلولی سویه واکسن تیلریوز گاوی مورد توجه قرار گرفت. توالی‌های مورد نظر ابتدا با PCR تکثیر شده و تعیین توالی گردید. درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های ناحیه ITS و ژن 18S rRNA ترسیم شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن 18S rRNA دارای ارزش شناسایی در حد جنس و توالی ITS در حد گونه می‌باشد. یافته‌های حاصل از بررسی درخت فیلوژنی توالی کامل ژن 18S rRNA نشان داد گونه‌های بیماری‌زای *T.annulata*، *T.lestoquardi* و *T.parva* در یک خوشه و مستقل از سایر گونه‌های تیلریا قرار می‌گیرند.

کلمات کلیدی: واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، تیلریا، ITS، 18SrRNA

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 85-95

Phylogenetic study of *Theileria annulata* isolates from Alborz province by using 18S rRNA gene and ITS regions sequences

By: Afshari, A. Msc Razi Vaccine and Serum Research

Habibi, Gh.R., Assistant Professor Razi Vaccine and Serum Research

Esmailnia, K., Assistant Professor Razi Vaccine and Serum Research

Shayan, P., Professor College of Veterinary Tehran University

Email: g.habibi@rvsri.ac.ir

Received: June 2014 Accepted: May 2014

Tropical theileriosis is a tick-transmitted disease which caused by obligative intracellular protozoan *Theileria annulata*. Diagnosis is usually based on identification of parasite in Giemsa stained smears of peripheral blood, spleen or lymph nodes. Today, the molecular methods with high sensitivity and specificity are used for diagnosis of infected and carrier animals, epidemiological and phylogenetic studies. Due to the presence of bovine theileriosis in Iran, *T. annulata* phylogenetic analysis has been focused using 18S rRNA gene and ITS region sequences (ITS1, 5.8S rRNA, ITS2) for two Alborz *Theileria annulata* isolates and bovine theileriosis vaccine strain S15 cell line. The target sequences were amplified by PCR and further PCR product sequencing. The phylogenetic tree were constructed based on 18S rRNA complete gene sequences and ITS region, then the sequences of Iranian isolates and registered *Theileria* sequences from other countries registered in GenBank were compared. The obtained results showed that the 18S rRNA gene and ITS sequence are valuable for detection and classification at the species and subspecies levels, respectively. Other important finding obtained from the present study was the result from phylogenetic tree of complete 18S rRNA gene sequences that revealed the highly pathogenic *Theileria* spp. (lymphoproliferative *Theileria*) including *T. annulata*, *T. lestoquardi* and *T. parva* were placed in a separate cluster away from the other *Theileria* spp.

Keywords: Phylogeny, *Theileria*, 18S rRNA, ITS

مقدمه

تیلریوز گرمسیری بیماری انگلی است که عامل آن تک‌یاخته داخلی سلولی اجباری از جنس تیلریا می‌باشد. تک‌یاخته تیلریا بوسیله کنه‌های جنس هیالوما به بدن سسم‌داران وحشی و غیر وحشی منتقل شده و سبب ایجاد بیماری در آنها می‌گردند (۱۰). تیلریا در گاو و گوسفند در آفریقا، آسیا، اروپا و استرالیا گسترش داشته و دارای تنوعی از کنه‌های ناقل می‌باشد. تیلریا در گاو دو گونه مهم از نظر بیماری‌زایی دارد: *T. parva*، عامل بیماری تب ساحل شرقی در شرق و مرکز آفریقا بوده و تیلریا آنولاتا که عامل تیلریوز گرمسیری در حاشیه مدیترانه، خاورمیانه و آسیا است (۱۷). علاوه بر دو گونه بیماری‌زای *T. annulata* و *T. parva* در گاو، گونه‌های دیگری نیز با بیماری‌زایی خفیف وجود دارند که *mutans*، *velifera* و *taurotragi* در آفریقا و سه گونه *orientalis*، *sergenti* و *buffeli* در آسیا و اروپا بیشتر شیوع دارند. طبقه بندی تیلریاها بر پایه مشاهدات میکروسکوپی، خصوصیات فراساختاری، چرخه زندگی، کنه ناقل، انتشار جغرافیایی و میزبان مهره دار می‌باشد (۳).

با توجه به گسترش وسیع بیماری لازم است سویه‌ها و جدایه‌ها تشخیص و شناسائی شده و میزان قرابت آنها دقیقاً مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از دو ژن با خصوصیات مناسب در روش‌های فیلوژنی ملکولی استفاده شد. ژن اول مربوط به تک‌یاخته کوچک ریپوزومی

به نام 18S rRNA بوده و قطعه دوم، توالی مربوط به ناحیه ITS می‌باشد که خود شامل سه بخش، ۱) Internal transcribed spacer (ITS2) است و ۲) Internal transcribed spacer (ITS1)، 5.8S rRNA و ۳) Internal transcribed spacer (ITS2) است (۵، ۲۰۱).

استفاده از ژن تحت واحد کوچک ریپوزومی امروزه بعنوان یک شاخص برای طبقه بندی سیستماتیک و تجزیه و تحلیل تکاملی پذیرفته شده و توالی این ژن در بسیاری از ارگانیزم‌ها تعیین ردیف شده که منجر به تشکیل بانک اطلاعاتی بزرگی شده است (۱۵، ۱۴، ۶). عملکرد و ساختار ثابت ژن تحت واحد کوچک ریپوزومی امکان بهره‌گیری از این ژن را در میان گونه‌های مختلف فراهم نموده است. بطوریکه این ژن در بررسی‌های فیلوژنی یا تکاملی دلیل دارا بودن نواحی متغیر در توالی خود ارزشمند بوده و برای این منظور در تعیین ارتباط میان گونه‌ها بسیار مناسب است (۱۲). اصولاً ساختار ژنومی جنس تیلریا هاپلوئید بوده و دارای چهار کروموزوم می‌باشد. سایز ژنوم این تک‌یاخته یوکاریوتی دارای 1.06×10^6 جفت باز بوده بطوریکه تعداد ۴۰۳۵ ژن را کد می‌کند. از این میان تنها تعداد معدودی از توالی‌ها برای تشخیص و شناسائی تک‌یاخته بکار برده می‌شوند که می‌توان به ژن پروتئین سطحی مروزویت در *T. annulata* (Tams-۱) و ژن پروتئین سطحی تیلریا (SP) و ژن تحت واحد کوچک ریپوزومی (18S rRNA) اشاره داشت (۱۳، ۹، ۷).

استخراج DNA. استخراج DNA از نمونه‌های خون و رده سلولی S15 با روش پروتئیناز K انجام و مرحله خالص سازی DNA بدست آمده با روش فنل کلروفرم صورت گرفت. به طور خلاصه ابتدا ۰/۵ ml خون کامل با ۱ ml بافر لیز RBC مخلوط و سپس به رسوب سلولی بافر دارای ۰/۵ درصد محلول SDS افزوده و ۲۰ µl محلول پروتئیناز K با غلظت ۲۰ mg/ml اضافه کرده و در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس ۱۲۰ µl مخلوط فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) به آن افزوده و سانتریفوژ گردید. DNA در فاز آبی با اتانول خالص سرد رسوب کرده و پس از شستشو و خشک کردن در بافر TE حل شده برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۴، ۱۱ و ۲۲).

پرایمرهای اختصاصی *T. annulata* و دو ژن هدف. به منظور تشخیص قطعی تیلریا آنولاتا در نمونه‌های مشکوک با استفاده از جفت پرایمر (Tams F,R) که به طور اختصاصی برای ژن گلیکوپروتئین سطحی مرزوایت *T. annulata* یا Tams1 طراحی شده بود استفاده شد (Z۴۸۷۳۹). به منظور تکثیر ژن کامل تحت واحد کوچک ریبوزومی (18S rRNA) دو جفت پرایمر (18SF1, R1 و 18SF2, R2) با استفاده از توالی (NC_۰۱۱۱۲۹) طراحی شد. همچنین جفت پرایمر (ITSF, R) برای تکثیر ناحیه ژنومی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S rRNA با استفاده از توالی HM۵۳۸۲۶۴ طراحی شد. کلیه طراحی‌های مربوط به پرایمرها با استفاده از نرم افزار (Gene runner program, Version ۳/۰۵) انجام پذیرفت (جدول ۱).

هدف از این مطالعه تعیین توالی ژن کامل 18S rRNA و ITS *T. annulata* سویه واکسن S15 به همراه دو جدایه استان البرز می باشد تا نتایج آن در کنار توالی‌های ثبت شده در بانک ژن برای تجزیه و تحلیل تکاملی و ترسیم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

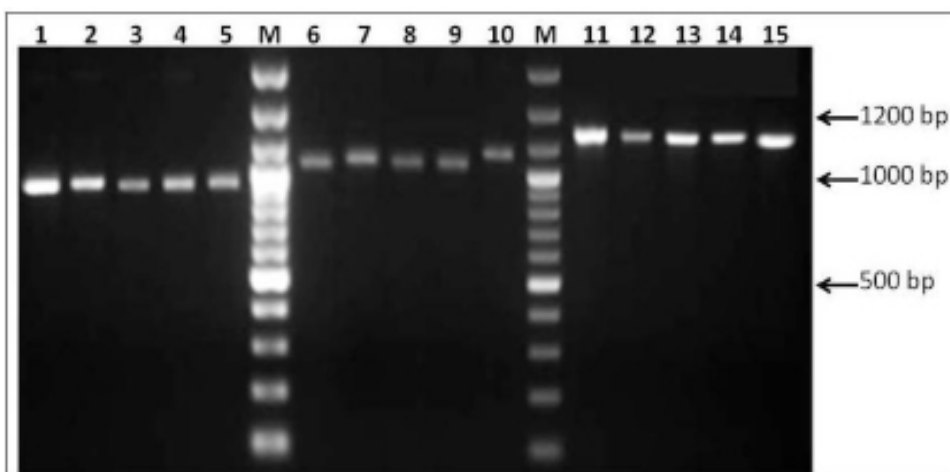
تک یاخته *T. annulata*. نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل رده سلولی آلوده به *T. annulata* سویه واکسن S15 که در بخش تولید واکسن‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به طور معمول جهت تولید واکسن تیلریوز گاوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رده سلولی S15 در محیط کشت سلولی Stoker رشد و تکثیر یافته و رسوب سلولی تهیه و تا زمان استخراج DNA در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. علاوه بر نمونه فوق در فصل فعالیت کنه‌ها که اوج شیوع بیماری است در ماه‌های اردیبهشت و خرداد سال ۱۳۹۱ تعداد ۸ نمونه خون از گاوها و گوساله‌های مشکوک به تیلریوز که جهت درمان به کلینیک‌های واقع در استان البرز مراجعه می‌کردند اخذ گردید. نمونه گیری از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و به مقدار ۵ میلی لیتر انجام گردید و همزمان از خون محیطی نیز گسترش خونی تهیه شد. نمونه‌ها پس از تهیه بلافاصله در کنار کیسه‌های یخ به آزمایشگاه انتقال یافته و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (°C)	شماره دسترسی (GenBank)	منبع
Tams1	F: GATGTTGTCCAGGACCACCTCAA G	۸۷۱	۵۶	Z۴۸۷۳۹	Habibi و همکاران. ۲۰۰۷
	R: GAT AAG TTG TTA CGA ACA TGG				
18S rRNA	F1: GAT CAA ATA GGA TCG ATG G	۹۱۸	۵۶	NC_۰۱۱۱۲۹	Habibi و همکاران. ۲۰۱۲ Present study
	R1: CAG ATA CCG TCG TAG TCC				
18S rRNA	F2: TCA ATT CCT TTA AGT TTC AGC C	۱۲۷۳	۵۶	NC_۰۱۱۱۲۹	Present study
	R2: ACA ATA GCC ACG AGT TGG				
ITS	F: GAG AAG TCG TAA CAA GGT C	۱۰۵۳	۵۶	HM۵۳۸۲۶۴	Present study
	R: CTT CAC TCG CCG TTA CTA G				

مدت ۳ دقیقه و متعاقب آن ۳۵ دور تکرار که هر دور شامل یک مرحله ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه (مرحله واسرشت شدن)، دمای ۵۶ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه (مرحله اتصال پرایمر) و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (مرحله طولیل شدن) بود و در انتها مرحله طولیل شدن نهایی شامل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود. در تمامی واکنش‌های PCR از DNA واکسن تیلریوز گاوی (*Theileria annulata*) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش PCR. محلول واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ mM KCl، ۱۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM MgCl_۲، ۱/۵ mM dNTPs mix، ۲۰۰ µM Triton X-100، ۰/۱٪ Taq DNA polymerase ۰/۵ U و پرایمرها با غلظت ۱۰ pmol به همراه DNA الگو با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne, Germany) انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای واکنش PCR با پرایمرهای TamsF, R، 18SF1, R1، 18SF2, R2 و ITSF و R شامل یک مرحله واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به



شکل ۲: تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن 18S rRNA و ناحیه ITS جدایه‌های تیلریا آنولاتا. شماره‌های ۱ تا ۴ مربوط به جدایه‌های استان البرز و شماره ۵ سویه واکسن تیلریوز بوده که با پرایمرهای 18S rRNA FIR1 تکثیر شدند و تولید قطعه ۹۱۸ جفت بازی داشتند. شماره‌های ۶ تا ۹ مربوط به جدایه‌های استان البرز و شماره ۱۰ سویه واکسن تیلریوز بوده که با پرایمرهای ITS تکثیر شدند و تولید قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی داشتند. شماره‌های ۱۱ تا ۱۴ مربوط به جدایه‌های استان البرز و شماره ۱۵ سویه واکسن تیلریوز بوده که با پرایمرهای 18S rRNA F2R2 تکثیر شدند و تولید قطعه ۱۲۷۳ جفت بازی داشتند. M، سایز مارکر ۱۰۰ bp است.

جدول ۲: شماره‌های دسترسی، اندازه و نام قطعات به دست آمده مربوط به ژن 18S rRNA و ناحیه ITS

ردیف	نام نمونه	اندازه قطعه (bp)	نام ژن	شماره دسترسی توالی ثبت شده در GenBank
۱	Alb1	۱۹۷۷	18S rRNA	KF429799
۲	Alb2	۱۸۳۴	18S rRNA	KF429800
۳	Vac S15	۱۸۸۹	18S rRNA	KF429795
۴	Alb1	۱۰۰۸	ITS	KF429796
۵	Alb2	۱۰۴۲	ITS	KF429797
۶	Vac S15	۱۰۷۸	ITS	KF429798

و پائین ترین میزان تشابه مربوط به گونه تیلریا اکوتی (AY534882) از کشور اسپانیا به میزان ۹۱/۹ درصد می‌باشد.

نتایج درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ژن 18S rRNA

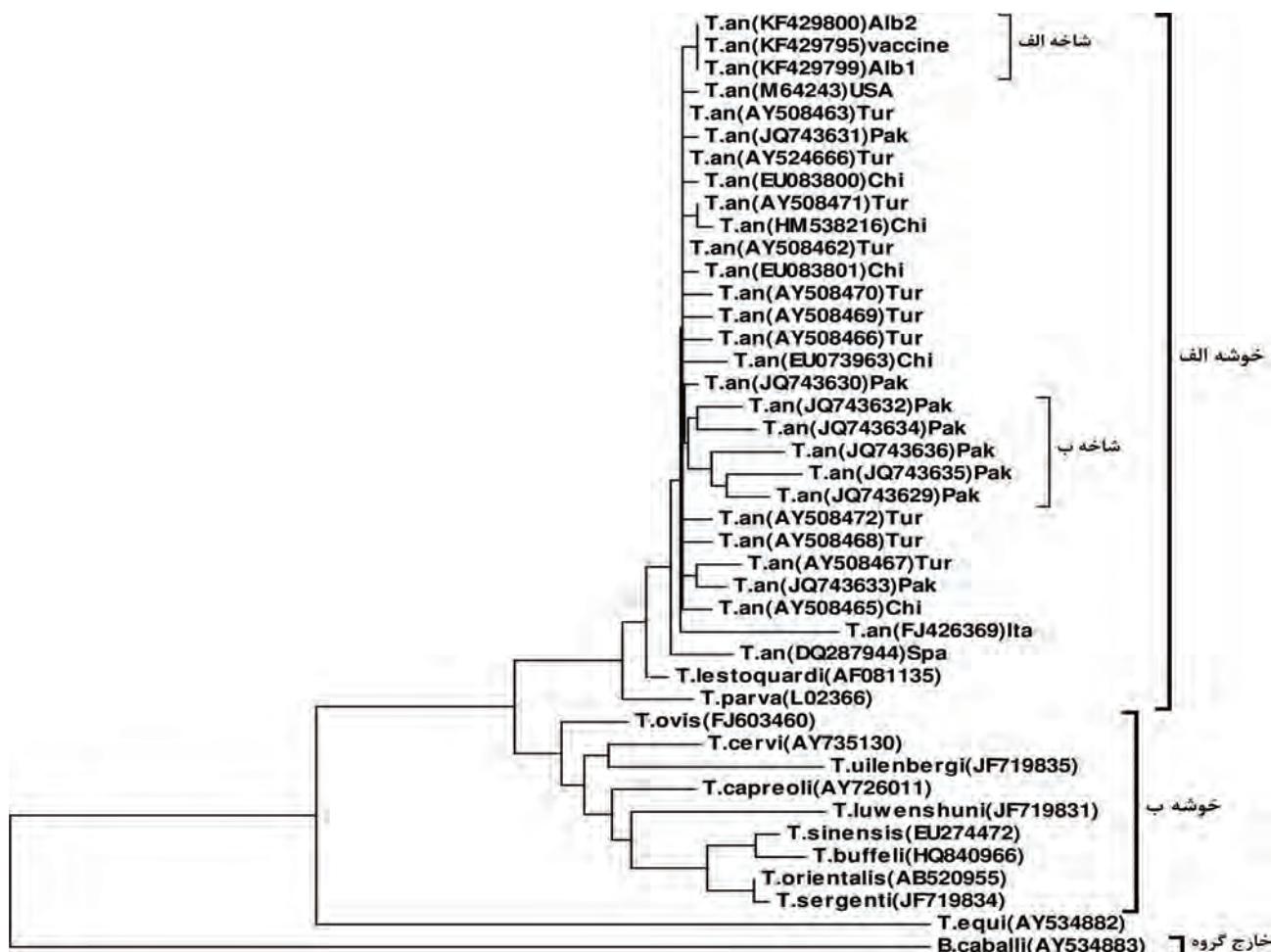
درخت فیلوژنی ترسیم شده حاصل از توالی‌های کامل ژن 18S rRNA نشان داد که ایزوله‌های جدا شده از استان البرز و سویه واکسن تیلریوز به همراه دیگر ایزوله‌های تیلریا آنولاتا در خوشه (الف) قرار می‌گیرند. همانطوری که در توپولوژی درخت دیده می‌شود دیگر گونه‌های بیماریزای

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنی ژن 18S rRNA

بررسی میزان تشابه توالی کامل تحت واحد کوچک ریبوزومی مربوط به *T. annulata* سویه واکسن ایران S15 با جدایه‌های استان البرز ۱۰۰ درصد و با سایر جدایه‌ها و سویه‌های *T. annulata* ثبت شده در بانک ژن بین ۹۹/۲ درصد مربوط به سویه‌ای از کشور ایتالیا (FJ426369) تا ۹۹/۹ درصد با سویه‌ای کشور ترکیه (AY524666) نشان داده شد. بالاترین میزان تشابه *T. annulata* سویه واکسن ایران با سایر گونه‌های تیلریا مربوط به گونه *T. lestoquardi* (AF081135) به میزان ۹۹/۵ درصد

T. sergenti, *T. buffeli*, *T. orientalis*, *T. sinensis*, *T. luwenshuni* و *T. capreoli* می‌باشد. در این بررسی توالی ژن 18S rRNA مربوط به دو گونه *T. equi* و *Babesia caballi* به عنوان توالی خارج گروهی (Out group) در نظر گرفته شد (شکل ۳).

تیلریا، مانند *T. parva* و *T. lestoquardi* نیز در واحدهای تاکسونومی جدا و نزدیک به شاخه *T. annulata* قرار گرفتند که همه آنها در داخل خوشه (الف) دیده می‌شوند. در خوشه (ب) اغلب گونه‌های غیر بیمارزیا و یا با بیمارزایی کم قرار گرفتند که شامل *T. servi*، *T. uilenbergi*، *T. ovis*،



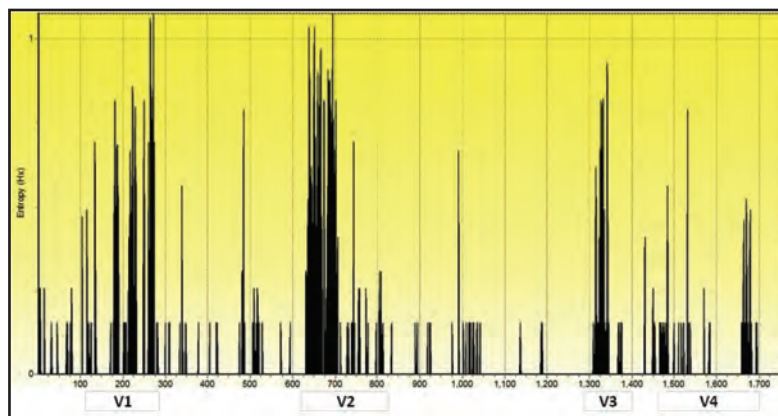
شکل ۳. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی ژن کامل 18S rRNA گونه‌های مختلف تیلریا. طول شاخه‌ها نشان دهنده مقدار تغییر فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مختلف می‌باشد. در خوشه (الف) تیلریاهای بیمارزیا شامل سه گونه آنولاتا، پاروا و لستوگاردی قرار دارند. در خوشه (ب) سایر گونه‌های بیمارزایی اندک و غیربیمارزیا جای گرفتند. در خوشه (الف) جدایه‌های *Theileria annulata* ایران در شاخه‌ای مجزا بنام (الف) و جدایه‌های *Theileria annulata* پاکستان در شاخه‌ای مجزا بنام شاخه (ب) دسته‌بندی شدند. دو توالی مربوط به گونه‌های تیلریا اکوئی و بابزیا کابالی با فاصله‌ای دورتر نسبت به دو خوشه (الف) و (ب) قرار گرفتند. اختصارات بکار رفته عبارتند از: *T. annulata*: Alb، *Theileria annulata*: T.an؛ جدایه البرز یک، Alb2؛ جدایه البرز دو، Vaccine؛ سویه واکسن ایران، Tur؛ ترکیه، Pak؛ پاکستان، Chi؛ چین، Ita؛ ایتالیا، Spa؛ اسپانیا و USA؛ ایالات متحده آمریکا.

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنی ناحیه ITS

هم‌ترازی توالی‌های ناحیه ITS نشان داد که علاوه بر وجود دو منطقه بسیار متغیر در ناحیه 1 (Internal transcribed spacer) و دو منطقه بسیار متغیر در ناحیه 2 (Internal transcribed spacer)، یک بخش بسیار حفاظت شده یا conserved در ناحیه 5.8S rRNA به اندازه تقریبی ۱۶۰ جفت باز وجود دارد. پس از هم‌تراز کردن توالی‌ها، ماتریکس

نقشه آنروپی توالی کامل 18S rRNA

پس از هم‌ترازی چندگانه توالی‌های کامل این ژن مربوط به گونه *T. annulata* در بانک ژن و توالی‌های بدست آمده، هیچ ناحیه متغیری در طول این ژن مشاهده نگردید در مقابل استفاده از توالی ژن 18S rRNA مربوط به گونه‌های مختلف تیلریا، چهار ناحیه مختلف را در طول ژن نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴: نمای آنترابی توالی کامل ژن 18S rRNA در بین گونه های مختلف تیلریا. چهار ناحیه V1-V4 نشاندهنده نواحی با تغییرات زیاد در طول این ژن می باشد. نواحی متغیر بصورت پیک های بلند و نواحی ثابت بشکل پیک های کوتاه یا بدون پیک مشخص می باشند. بیشترین تغییر در توالی این ژن مربوط به ناحیه V2 می باشد

نقشه آنترابی توالی کامل ITS

با توجه به وجود مناطق بسیار متغیر در دو ناحیه ITS1 و ITS2 و ناحیه بسیار حفاظت شده 5.8S در توالی نوکلئوتیدی ایزوله های مختلف تیلریا آنولاتا برای مشاهده محدوده این نواحی پلات یا نقشه آنترابی پس از تطابق چندگانه ۲۲ توالی *T. annulata* با استفاده از نرم افزار BioEdit استخراج گردید و مشخص شد که دو بخش بسیار متغیر V1 و V2 در ناحیه ITS1 و دو قسمت V3 و V4 در ناحیه ITS2 قرار دارد و ناحیه حفاظت شده 5.8S در بین دو ناحیه ITS1,2 قرار دارد (شکل ۶).

بحث

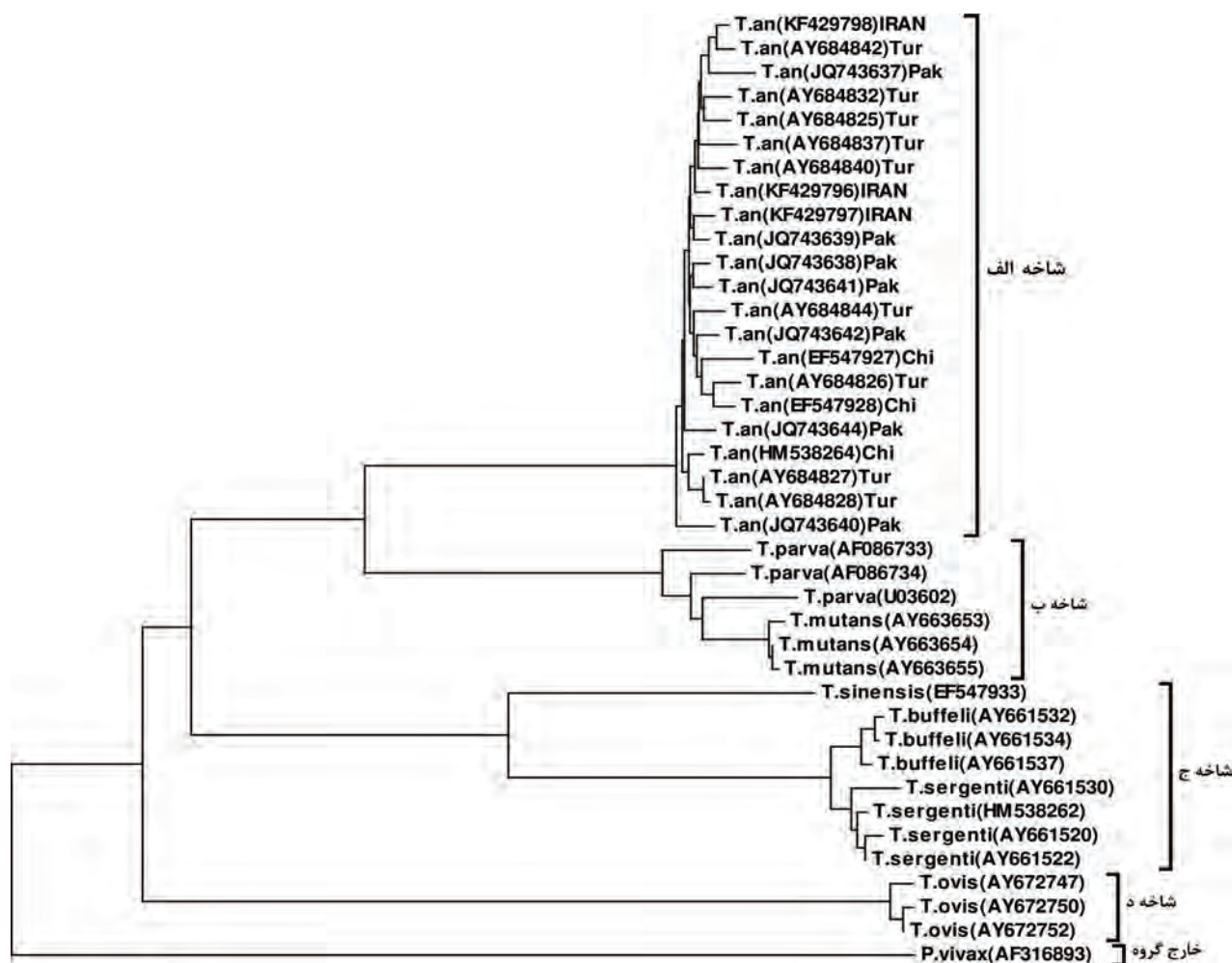
اصولاً استفاده از روش های ملکولی در تشخیص و شناسائی میکروارگانیسم ها به جهت حساسیت و ویژگی فوق العاده آنها که در حد یک نوکلئوتید می باشد این امکان را فراهم می کند که تشخیص و شناسائی گونه های نزدیک به هم، دارای شباهت بالای مرفولوژیک و بسیار نزدیک از نظر ویژگی های تکاملی عملی گردد. از طرفی شناسائی و تعیین خصوصیات سویه های واکسن و نیز سویه های وحشی که در طبیعت وجود دارند تنها با استفاده از روش های دقیق ملکولی و تجزیه و تحلیل های فیلوژنی میسر می باشد. این موضوع در ارتباط با قوانین حاکم بر تولید فرآورده های بیولوژیک با کیفیت (Good Manufacturing Practice = GMP) در تعیین مشخصات سویه های مختلف مورد استفاده در تولید واکسن و جدایه ها بسیار حائز اهمیت می باشد. با توجه به گزارشات منتشر شده، این تحقیق اولین گزارش استفاده از توالی ITS در مطالعات فیلوژنی ملکولی تیلریا و همچنین توالی یابی کامل ژن 18S rRNA سویه واکسن S15 و جدایه هائی از استان البرز می باشد.

در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن 18S rRNA سه نمونه *T. annulata* نشان دادند که هر چند تفاوت زیادی میان این ژن در میان سویه ها و جدایه های *T. annulata* دیده نمی شود ولی بر اساس یافته های نقشه آنترابی ژن 18S rRNA در میان گونه های مختلف تیلریا

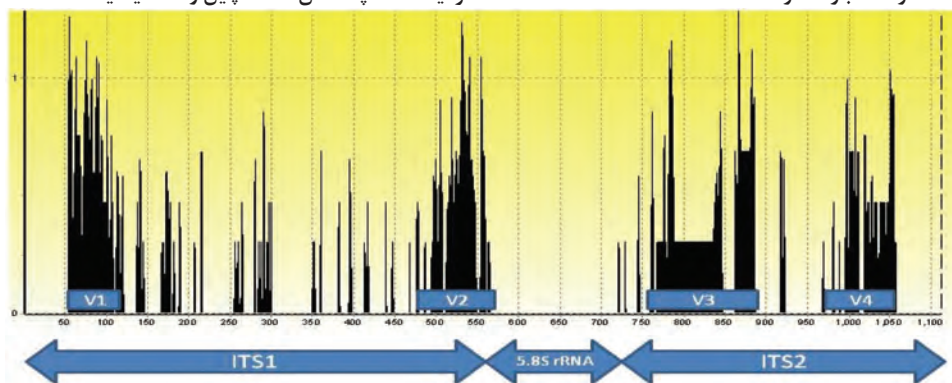
تشابه نواحی ITS با استفاده از نرم افزار BioEdit محاسبه و مشخص گردید که میزان تشابه میان دو جدایه استان البرز با هم ۹۲/۹ درصد، میزان تشابه جدایه یک و دو البرز با سویه واکسن S15 بترتیب ۸۶/۴ و ۸۵/۵ درصد می باشد و از طرفی بیشترین تشابه موجود میان توالی ITS سویه واکسن با نمونه ای از کشور ترکیه (AY۶۸۴۸۴۲) به میزان ۸۸/۱ درصد، نمونه یک استان البرز ۹۴/۱ درصد با نمونه ای از کشور ترکیه (AY۶۸۴۸۳۷)، و نمونه ۲ البرز بیشترین تشابه را با نمونه ای از کشور پاکستان (JQ۷۴۳۶۳۹) به میزان ۹۴/۱ درصد نشان دادند.

نتایج درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ITS

درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از سه توالی *T. annulata* ITS بدست آمده در این مطالعه به همراه ۹ توالی مربوط کشور ترکیه، ۷ توالی مربوط به کشور پاکستان و ۳ توالی مربوط به کشور چین در کنار ۳ توالی مربوط به *T. parva*، ۳ توالی مربوط به تیلریا موتانس، ۱ توالی مربوط به *T. sinensis*، ۳ توالی مربوط به *T. buffeli*، ۴ توالی مربوط به *T. sergenti*، ۳ توالی مربوط به *T. ovis* و نهایتاً یک توالی مربوط به پلاسمودیوم ویاکس به عنوان خارج گروهی استفاده گردید. بر اساس توپولوژی درخت ترسیم شده تمامی گونه های *T. annulata* در یک شاخه (الف) قرار گرفتند (شکل ۵). در داخل این شاخه توالی ناحیه ITS واکسن S15 با نمونه ای از کشور ترکیه (Accession # AY۶۸۴۸۴۲) در یک واحد تاکسونومیکی قرار گرفته و نمونه شماره ۱ استان البرز در واحد تاکسونومی دیگری قرار گرفت از طرفی نمونه شماره دو استان البرز در یک واحد تاکسونومی به همراه نمونه ای از کشور پاکستان (Accession # JQ۷۴۳۶۳۹) جای گرفت. در شاخه (ب) *T. parva* و تیلریا موتانس با فاصله نزدیک به *T. annulata* قرار داشته و در شاخه (ج) گونه های *T. buffeli*، *T. sergenti*، *T. sinensis* قرار داشتند. در شاخه (د) بوده و نمونه پلاسمودیوم ویاکس به عنوان خارج گروهی در شاخه ای مجزا جای گرفت (شکل ۵).



شکل ۵: درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی کامل ناحیه ITS کامل تیلیریا آنولاتا. طول شاخه‌ها نشان دهنده مقدار تغییر فاصله ژنتیکی بین توالی‌های مختلف می‌باشد. نکته مهم در این درخت جدا شدن تمامی گونه‌های تیلیریا آنولاتا در شاخه الف، گونه‌های پاروا و موتانس در شاخه ب، گونه‌های بوفلی و سرجنتی در شاخه ج و گونه اویس در شاخه د می‌باشد. اختصارات بکار رفته عبارتند از: T.an: *Theileria annulata*, Tur: ترکیه، Pak: پاکستان، Chi: چین، Ita: ایتالیا.



شکل ۶: نقشه یا نمای آنروپی ناحیه ITS مربوط به ۲۲ توالی تیلیریا آنولاتا. ردیف نوکلئوتیدی ۵۵۰-۱ مربوط به ناحیه ITS۱، ۷۱۰-۵۵۱ مربوط به ژن 5.8S rRNA و از نوکلئوتید ۱۱۰۰-۷۱۱ مربوط به ناحیه ITS۲ می‌باشد. نواحی متغیر به صورت پیک‌های بلند و نواحی ثابت به شکل پیک‌های کوتاه یا بدون پیک مشخص می‌باشند

شده نشان داد که این دو تیلریا در دو گروه متمایز قرار گرفته بطوریکه *T. lestoquardi* در گروه تیلریاهای لنفوپرولیفراتیو در کنار *T. annulata* و *T. parva* ولی جدایه جدید تیلریا در گروه تیلریاهای غیرلنفوپرولیفراتیو در کنار *T. buffeli* و *T. sergenti* قرار می‌گیرد (۲۳).

مطالعه فیلوژنی انجام شده با استفاده از قطعه ژن 18S rRNA به اندازه تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز مربوط به سویه واکسن تیلریوز گاوی سویه S15 و جدایه *T. annulata* از کردستان عراق در کنار سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نشان داد تشابه این ناحیه در دو سویه و جدایه فوق ۱۰۰ درصد و با توالی‌های مربوط به چین، اسپانیا و ایتالیا بین ۹۷ تا ۹۹/۹ درصد می‌باشد (۸). در مطالعه Aktas و همکاران (۲۰۰۷) که با استفاده از توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-ITS2-5.8S روی ۱۶ جدایه تیلریا صورت گرفت نشان داد که هرگونه تیلریا از نظر اندازه و توالی نواحی ITS1 و ITS2 منحصر به فرد می‌باشد. درجات مختلفی از پلیمرفیسم در این نواحی، چه در داخل و چه در بین گونه‌های مختلف تیلریاهای نشخوارکنندگان دیده می‌شود. بیشترین میزان پلیمرفیسم در این نواحی، در داخل یک گونه مربوط به عامل تیلریوز گرمسیری (*T. annulata*) و کمترین میزان پلیمرفیسم در گونه‌های خوش خیم، تیلریا بوفلی و تیلریا سرجنتی بدست آمد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که دو ناحیه بسیار متغیر در هر یک از دو ناحیه ITS1 و ITS2 در جدایه‌های مختلف *T. annulata* وجود دارد که این میزان پلیمرفیسم بین ۸۵/۵ تا ۹۴/۱ متغیر بوده و این در حالی است که تشابه ۱۰۰ درصدی ژن 5.8S rRNA در ایزوله‌های مختلف *T. annulata* به ثبت رسید. نتایج حاصل از بررسی و تحلیل فیلوژنی نظیر محاسبه ماتریکس تشابه نوکلئوتیدی و ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس نواحی مذکور نشان داد که توالی ژن 5.8S rRNA به علت تشابه بسیار زیاد در میان ایزوله‌ها و حتی گونه‌های مختلف تیلریا از قدرت تفکیک پذیری بسیار پایینی در تمایز برخوردار است، در مقابل نواحی ITS1 و ITS2 به علت پلیمرفیسم زیاد در طول و توالی نوکلئوتیدی، قادر به تفکیک گونه‌ها و حتی جدایه‌های مختلف گونه تیلریا آنولاتا می‌باشند. به منظور مقایسه دو ناحیه ITS و ژن 18S rRNA، علیرغم تشابه ۱۰۰ درصدی در توالی ژن 18S rRNA برای سه نمونه مورد بررسی، دو ناحیه ITS1، ITS2 دارای تنوع بالا و کاملاً اختصاصی بود. با توجه به نقشه آنروپی ژن 18S rRNA بیشترین میزان تغییر در توالی نوکلئوتیدی در ناحیه متغیر V2 مشاهده گردید. درخت ترسیمی بر اساس توالی این ناحیه کوچک V2 نتایج مشابهی نظیر درخت ترسیم شده بر اساس توالی کامل ژن 18S rRNA ایجاد کرد با توجه به این که این ناحیه فقط طولی در حدود ۲۰۰ جفت باز دارد، به نظر می‌رسد استفاده از توالی این ناحیه به منظور بررسی‌های فیلوژنی صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای از نظر زمان و هزینه داشته باشد.

هر چند در این مطالعه از توالی کامل ژن 18S rRNA استفاده شد ولی با توجه به اینکه توالی کامل این ژن در ایران تا بحال گزارش نشده بود توالی‌های بدست آمده در این مطالعه با دیگر توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک ژن مقایسه گردید و درخت فیلوژنی بر اساس توالی کامل (حدود ۱۷۵۰ جفت باز) ترسیم گردید. نتایج نشان داد که هر سه توالی مورد بررسی در این مطالعه در یک گروه قرار گرفته و همچنین تعدادی از توالی‌های *T. annulata* مربوط به کشور پاکستان نیز در یک گروه مستقل جای

می‌توان با استفاده از این ژن، تشخیص تیلریا در حد گونه انجام و گونه‌های تیلریا از هم تفکیک شوند (شکل ۴). از طرفی نتایج درخت فیلوژنی نشان داد که هر سه گونه تیلریای بیماریزا یعنی *T. parva*، *T. annulata* و *T. lestoquardi* در یک شاخه قرار می‌گیرند (شکل ۳).

با توجه به وجود تشابه بالای ژن 18S rRNA در میان سویه‌ها و جدایه‌های *T. annulata*، امروزه منطقه دیگری که در بررسی‌های فیلوژنی استفاده می‌شود مربوط به ناحیه ITS است که خود شامل دو ناحیه ITS1 و ITS2 و یک منطقه حدواسط ژن 5.8S rRNA می‌باشد. نتایج نشان داد که توالی ژن 5.8S rRNA در میان گونه‌های مختلف تیلریا شدیداً دست نخورده و ثابت بوده و بنابراین در تشخیص و شناسایی گونه‌ها و جدایه‌ها از گویائی مناسبی برخوردار نمی‌باشد. در مقابل توالی قطعات ITS1 و ITS2 بسیار متغیر بوده و از تنوع بالائی برخوردارند. بطوریکه حتی میزان تشابه دو توالی جدایه یک و دو استان البرز ۹۲/۹ درصد بوده و این در صورتی است که این میزان تشابه در مورد ژن 18S rRNA ۱۰۰ درصد بود. به همین ترتیب میزان تشابه سویه واکسن S15 با دو جدایه یک و دو به ترتیب ۸۶/۴ و ۸۵/۵ درصد بود که بخوبی مشخص می‌گردد که توالی‌های ITS به منظور تفکیک و شناسایی تیلریاها در حد جدایه‌ها و سویه‌ها قابل استفاده هستند. تفاوت و تنوعی که در ردیف نوکلئوتیدی نواحی ITS وجود دارد حاکی از ارزش این نواحی در تمایز گونه‌ها و سویه‌های مورد بررسی است به طوری که در دو جدایه تعیین ردیف شده از استان البرز اختلاف قابل ملاحظه‌ای در این نواحی مشاهده می‌شود. بررسی دقیق درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس توالی ITS نشان می‌دهد که قرار گرفتن توالی‌های ITS مربوط به جدایه‌های یک و دو البرز به ترتیب در کنار سویه‌های ترکیه و پاکستان در واحدهای تاکسونومی مختلف با توجه به درصد میزان تشابه توالی‌ها قابل پیش بینی می‌باشد (شکل ۵). درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی ITS نشان داد که به علت اختلاف نسبتاً زیاد موجود در ردیف توالی‌ها، جدایه‌ها و سویه‌های مختلف *T. annulata* از کشورهای مختلف در کنار هم قرار نگرفته هر چند همگی آنها در یک شاخه مستقل (الف) و جدا از سایر گونه‌ها جای گرفتند (شکل ۵).

برخی اختلاف نظرها در مورد جایگاه طبقه‌بندی سیستماتیک یا تاکسونومی برخی ارگانیسیم‌ها نیز با استفاده از مطالعات فیلوژنی قابل بیان می‌باشد. به عنوان مثال گونه‌های *T. buffeli* و *T. sergenti* که در گذشته مترادف با تیلریا موتانس تصور می‌شدند امروزه با استفاده از توالی ژن تحت واحد کوچک ریپوزومی و مقایسه آن با سایر گونه‌ها نشان داده شد که تیلریا موتانس از دو گونه دیگر قابل تفریق می‌باشد (۱۶).

امروزه مطالعات فیلوژنی در تعیین علت تلفات و ریشه‌یابی آنها و نهایتاً تلاش در جهت کنترل و ریشه‌کنی بیماری‌ها از ارزش بالائی برخوردار است. در افریقا علت تلفات نشخوارکنندگان که قبلاً به جنس *Cytauxzoon* نسبت داده می‌شد با بررسی‌های فیلوژنی ملکولی نشان داده شد که علت اصلی تلفات عفونت تیلریا می‌باشد (۲۰). در منطقه‌ای از شمال غرب چین مواردی از آلودگی به تک‌یاخته‌های خونی باویژگی‌های تیلریا لستوکاردی در نشخوارکنندگان کوچک گزارش شده بود که با بررسی‌های فیلوژنی انجام شده توسط Schnittger و همکاران در سال ۲۰۰۰ که بر پایه توالی ژن 18S rRNA بود مشخص گردید که ایزوله جدید تیلریا از تیلریا لستوکاردی متفاوت بوده و درخت فیلوژنی ترسیم

K., Philippe, H. et al. (1999) Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Veterinary Parasitology*, 83: 99-105.

6-Ellis, J., Hefford, C., Baverstock, P.R., Dalrymple, B.P. and Johnson, A.M. (1992) Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54:87-95.

7- Gardner, M.J., Bishop, R., Shah, T., de Villiers, E.P., Carlton, J.M., Hall, N., et al. (2005) Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science*, 309(5731):134-7.

8-Habibi, G.R. (2012) Phylogenetic Analysis of *Theileria annulata* Infected Cell Line S15 Iran Vaccine Strain. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(2): 73-81.

9-Habibi, G.R., Esmail-Nia, K., Bozorgi, S., Najjar, E., Hashemi-Fesharki, R., and Bordbar, N. (2007) PCR-based detection of *Theileria* infection and molecular characterization of Tams1T. *annulata* vaccine strain. *Archives of Razi Institute*, 62(2):83-89.

10-Hashemi-Fesharki, R., Habibi, G.R. and Ahour, P. (1998) Delayed type hypersensitivity theilerin test in cattle vaccinated against *Theileria annulata* infection. *Veterinary Parasitology*, 75: 261-263.

11-Herrmann, B.G. and Frischauf, A.M. (1987) Isolation of genomic DNA. *Methods in Enzymology*, 152: 180-3.

12-Hillis, D.M. and Dixon, M.T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4): 411-53.

13- 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. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(1): 99-106

14-Kakuda, T., Shiki, M., Kubota, S., Sugimoto, C., Brown, W.C., Kosum, C., et al. (1998) Phylogeny of benign *Theileria* species from cattle in Thailand, China and the USA based on the major piroplasm surface protein and small ribosomal RNA genes. *International Journal for Parasitology*, 28: 1261-7.

15-Katzer, F., McKellar, S., Kirvar, E. and Shiels, B. (1998) Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95: 33-44.

16-Levine, N.D., (1985) *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, Ames. P: 414.

17-Marquardt W.C., Demaree R.S. and Grieve R.B. (2000), *Parasitology Vector Biology*, 2nd edition. P: 221.

گرفتند هر چند بطور کلی درخت ترسیم شده بر مبنای ژن 18S rRNA نتوانست انتظار تفکیک مناطق جغرافیائی را برای جدایه‌ها و سویه‌های مورد بررسی تامین کند. بیشترین میزان تشابه میان گونه‌های مختلف تیلریا بین دو گونه آنولاتا و لستوکاردی مشاهده شد که بمیزان ۹۹/۵ درصد بود با توجه به اینکه نواحی انتشار جغرافیایی دو گونه فوق همپوشانی زیادی دارند و از طرفی هر دو گونه بوسیله کنه‌های هیالوما منتقل می‌شوند ممکن است موضوع آلودگی طبیعی گاو به تیلریا لستوکاردی قابل توجه باشد (۱۹،۲۴). کمترین تشابه بین گونه ای در توالی ژن 18S rRNA بین *T. annulata* و *T. equi* بمیزان ۹۱/۹ درصد بود بطوریکه نتایج درخت فیلوژنی ترسیم شده نیز نشان داد که تیلریا اکوئی در شاخه ای مجزا قرار می‌گیرد و دلیل تغییر نام تیلریا اکوئی به بایزیا اکوئی شاید تفاوت فوق باشد (۱۸،۲۱). نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که توالی ناحیه ITS با توجه به پلیمرفیسم زیاد می‌تواند در تفکیک ایزوله‌های مختلف یک گونه مورد استفاده قرار گیرد ولی استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن تحت واحد کوچک ریپوزومی (18S rRNA) در تمایز گونه‌های مختلف تیلریا قابل توصیه می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از بکارگیری دو ژن 18S rRNA و ناحیه ITS می‌توان ارزش هر کدام از توالی‌های فوق را در تعیین میزان ارتباط فیلوژنی جدایه‌ها و سویه‌ها در سطح جنس، گونه و زیر گونه مورد استفاده قرار داد هر چند در ادامه اینگونه مطالعات امکان بهره‌برداری از ژن‌های دیگری نظیر سیتوکروم b که برخلاف 18S rRNA دارای شدت تکاملی سریعی است می‌تواند نقش موثری در تعیین جایگاه تاکسونومی سویه‌ها و جدایه‌های جدید داشته باشد.

تشکر و قدردانی

اجرای این پژوهش با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران میسر شده است. از همکاران بخش تحقیق و تولید واکسن‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بویژه سرکار خانم بزرگی تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

- 1- Ahmed, J.S., Luo, J., Schnittger, L., Seitzer, U., Jongejan, F. and Yin, H. (2006) Phylogenetic position of small ruminant infecting piroplasms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081: 498-504.
- 2- Aktas, M., Bendele, K.G., Altay, K., Dumanli, N., Tsuji, M. and Holman, P.J. (2007) Sequence polymorphism in the ribosomal DNA internal transcribed spacers differs among *Theileria* species. *Veterinary Parasitology*, 147(3-4): 221-230.
- 3- Allsopp, M.T.E.P., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T. and Allsopp, B.A. (1994) Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, (108): 147-153.
- 4- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley and Sons, New York).
- 5- Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio, T., Terada, Y., Fujisaki,

- 18-Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina A. et al. (2010) Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: *A preliminary study. Veterinary Journal*, 184(3): 346-350.
- 19-Namavari, M., Ezhdehakosh-pour, S., Habibi, G.R., Rahimian, A. and Namazi, F. (2013) First isolation and establishment of in vitro culture of *Theileria lestoquardi* from a naturally infected cow. *Journal of Parasitic Diseases*, DOI: 10.1007/s12639-013-0309-2
- 20-Nijhof, A.M., Pillay, V., Steyl, J., Prozesky, L., Stoltz, W.H., Lawrence, J.A. et al. (2005) Molecular characterization of Theileria species associated with mortality in four species of African antelopes. *Clinical Microbiology*, 43(12): 5907-5911.
- 21-Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007) *Veterinary Medicine*. 10th Ed. Saunders, Philadelphia, pp: 1484-97.
- 22-Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A laboratory Manual* , Volume 3 , Cold Spring Harbor Laboratory ; NY,B.16
- 23-Schnittger, L., Yin, N., Jianxun, L., Luding, W., Shayan, P., Rahbari, S. et al. (2000) Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. *Parasitology Research*, 86: 352-358.
- 24-Taha, K.M., Salih, D.A., Ali, A.M., Omer, R.A. and El Hussein, A.M. (2013) Naturally occurring infections of cattle with *Theileria lestoquardi* and sheep with *Theileria annulata* in the Sudan. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2): 143-5.

