

Morphological and Molecular Study of Blood Parasites in Camels in South Khorasan Province, 2020

Razieh Rahimi¹,
Seyed Abolghasem Siyadatpanah²,
Shirzad Gholami³,
Seyed Abdollah Hosseini⁴,
Ahmad Daryani³,
Seyyed Ali Shariatzadeh¹,
Sabah Mayahi⁵,
Shahabeddin Sarvi⁶

¹ MSc in Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Ferdows School of Paramedical and Health, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD in Molecular Medicine, Department of Medical Mycology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Associate Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 7, 2021 ; Accepted October 9, 2021)

Abstract

Background and purpose: Camel breeding is common in East of Iran due to its semi-arid climate and desert conditions. It transmits some diseases to other ruminants and humans due to carrying common blood parasites between humans and animals. This work aimed at studying the presence of *Trypanosoma* and *Piroplasmida* (*Babesia* and *Theileria*) species in camels in South Khorasan province using parasitological and molecular methods.

Materials and methods: In this study, blood samples were taken from 200 camels in South Khorasan that were randomly selected in 2020. Then, thick and thin smear were prepared from the samples and stained with Giemsa staining technique and examined under a light microscope. For molecular detection of *Trypanosoma*, *Theileria* and *Babesia*, specific primers of each genus were used.

Results: Microscopic examination showed that out of 200 blood samples, 8 samples (4%) were infected with *Trypanosoma* and no samples were infected with *Theileria* and *Babesia*. According to molecular experiments, six samples (3%) had DNA of *Trypanosoma evansi* and five samples (2.5%) were found with *Trypanosoma brucei* DNA. But the DNA of *Theileria* and *Babesia* were not observed. Phylogenetic analysis showed that the sample isolated in the present study had a high genetic affinity with genotype A of *Trypanosoma evansi*.

Conclusion: To the best of our knowledge, this was the first study to investigate the prevalence of Surra in South Khorasan province. The presence of *Trypanosoma* in the blood of camels in this region signifies the need for a careful monitoring system and evaluation studies as a prerequisite for controlling blood parasitic diseases in camels in South Khorasan.

Keywords: blood parasites, camels, South Khorasan, morphology and molecular methods

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (202): 106-115 (Persian).

* Corresponding Author: Shahabeddin Sarvi - Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: shahabesarvi@yahoo.com)

بررسی مرفولوژی و مولکولی انگل‌های خونی در شترهای استان خراسان جنوبی در سال 1399

راضیه رحیمی¹

سید ابوالقاسم سیادت پناه²

شیرزاد غلامی³

سید عبدالله حسینی⁴

احمد دریانی³

سید علی شریعت زاده¹

صبح میاهی⁵

شهاب الدین سروی⁶

چکیده

سابقه و هدف: پرورش شتر در شرق ایران با توجه به داشتن اقلیم نیمه خشک و شرایط بیابانی آن رایج می‌باشد. این حیوان حامل انگل‌های مشترک خونی بین انسان و دام بوده و در انتقال برخی از بیماری‌های مشترک به انسان نقش دارد. این مطالعه با هدف بررسی وجود انگل‌های خونی تریانوزوما و پیروپلاسمیدا (تیلریا و بابزیا) در شترهای استان خراسان جنوبی با روش‌های انگل شناسی و مولکولی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، از 200 نفر شتر در منطقه خراسان جنوبی که به صورت اتفاقی انتخاب شده بودند، نمونه خون تهیه شد. از نمونه‌ها گسترش ضخیم و نازک تهیه و رنگ آمیزی گردید و سپس در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. برای تشخیص مولکولی تریانوزوما، تیلریا و بابزیا در روش مولکولی از پرایمرهای اختصاصی هر جنس برای تمام نمونه‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج آزمایش میکروسکوپی نشان داد که 8 نمونه (4 درصد) شترها آلوده به انگل تریانوزوما بودند و هیچ نمونه‌ای آلوده به تیلریا و بابزیا مشاهده نگردید. در بررسی مولکولی 6 نمونه (3 درصد) حاوی DNA انگل تریانوزوما و 5 نمونه (2/5 درصد) تریانوزوم بروسه‌ای بودند و DNA تیلریا و بابزیا مشاهده نشد. آنالیز فیلوژنی نشان داد که ایزوله‌های جدا شده در این مطالعه با ژنوتایپ A تریانوزوما اوانسی مقاربت ژنتیکی زیادی دارد.

استنتاج: مطالعه حاضر اولین مطالعه جهت بررسی انگل‌های خونی ژئونوز در شترهای استان خراسان جنوبی بوده که شیوع 5/5 درصد تریانوزوما، لزوم نیاز به یک سیستم نظارت دقیق و مطالعات ارزیابی به عنوان پیش نیاز اقدامات کنترلی بیماری‌های انگلی خونی مشترک بین انسان و دام در استان خراسان جنوبی تأکید دارد.

واژه های کلیدی: انگل های خونی، شتر، خراسان جنوبی، مرفولوژی و مولکولی

مقدمه

شتر حیوانی است که از زمان‌های قدیم به دلایل مختلفی از جمله حمل و نقل، تولید شیر، پشم و گوشت از آن بهره‌وری می‌شده است. شتر با توجه بهدارا بودن ویژگی‌های خاص از جمله تحمل کم آبی و مقاومت

مؤلف مسئول: شهاب الدین سروی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

1. کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استادیار، دانشکده پیراپزشکی و بهداشت فردوس، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
3. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، گروه آموزشی قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
6. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/12/17 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/5/3 تاریخ تصویب: 1400/7/18

در برابر گرمای هوا، حیوانی است که در مناطق گرم و خشک، بسیار با ارزش است (1). این حیوان می تواند به انواع انگل هایی که عامل بیمارهای خونی و گوارشی هستند آلوده گردد که سبب آسیب به این حیوان و کاهش مقاومت آن در برابر شرایط سخت، کاهش تولیدات آن ها و حتی کم خونی و مرگ می شوند. در میان انگل هایی که شتر ممکن است به آن ها آلوده گردد، *تریپانوزوما اوانسی* یکی از مهم ترین و جدی ترین آن ها محسوب می شود (1). این انگل اولین بار در سال 1880 میلادی توسط اوانس و همکاران در شترها و اسب های هندوستان دیده شد. *تریپانوزوما اوانسی* موجب بیماری سورا (Surra) در شتر بوده و تاکنون دامنه وسیعی از این حیوانات را در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان را آلوده کرده است (2). مگس های تابانیده ناقلین اصلی این انگل می باشند. این انگل گسترده ترین نوع از تریپانوزوماهای بیماریزا در جهان بوده و برای اولین بار در ایران، در شترهای یک کوهانه ایرانی، در سال 1932 میلادی شناسایی شد و در حال حاضر یکی از مهم ترین بیماری ها در گله های شتر می باشد (3). تریپانوزومیاژیس در خون و مایعات بدن تکثیر پیدا می کند به دو شکل حاد و مزمن در شتر رخ می دهد، که شکل مزمن بیماری شایع تر است و به صورت لاغری، تب متناوب، بیرنگی مخاطات، گهگاه ادم شکمی، کاهش وزن، کاهش تولید شیر و گوشت، علائم عصبی، لاغری مفرط و نهایتاً می تواند باعث مرگ میزبان شود (2). میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری بالای 20 درصد و میزان تلفات ممکن است به 100 درصد هم برسد (4-2). متأسفانه آلودگی شترهای مناطق مختلف جهان از جمله ایران به این انگل باعث ایجاد خسارات زیادی در صنعت دامپروری می شود.

تریپانوزوما اوانسی در انسان نیز می تواند آلوده کننده باشد و موارد زیادی از ابتلای انسان به این انگل از کشورهای مانند هند و ویتنام و کشورهای آفریقایی که در آن ها پرورش شتر رایج است گزارش شده است (7-5). در انسان ها این بیماری با علائمی مانند، تب، لرز، تعریق،

از دست رفتن حواس و سایر علائم درگیری سیستم اعصاب مرکزی خود را نشان می دهد (8). با توجه به موارد ذکر شده تشخیص آلودگی در شترها به این انگل تریپانوزوم چه از نظر اقتصادی در صنعت نگهداری و پرورش دام از نظر پزشکی هم بسیار مهم تلقی می شود. غیر از انواع تریپانوزوماها، آلودگی دیگری که در خون شترهای مناطق مختلف ایران باید مورد توجه قرار گیرد، *پیروپلاسما* شامل تیلریا و بابزیا است. این انگل ها بیماری و عوارض سختی را در حیوان ایجاد می کنند که از جمله می توان به، تب، آنمی و ادم اشاره کرد. لازم به ذکر است در موارد شدیدتر تیلریا و بابزیا حتی منجر به مرگ حیوان می شود. میزبان مهره دار اغلب نشخوارکنندگان بوده و با توجه به حضور ناقل آندر جغرافیای خشک و نیمه خشک ایران و وجود میزبانان مناسب از جمله شتر در این مناطق آلودگی به آن دیده شده است (9).

این انگل های خونی هم از جنبه دامپزشکی به خاطر خسارات فراوانی که به صنعت دامپروری وارد می کنند حائز اهمیت بوده و هم از نظر پزشکی، زیرا در موارد آلودگی با آن ها در انسان گزارش شده و جزو انگل های مشترک بین انسان و دام (زئونوز) محسوب می شوند (10). با توجه به مطالب ذکر شده، همچنین اهمیت اقتصادی و دامپزشکی آلودگی به تریپانوزوما و پیروپلاسما و از آن جا که تاکنون مطالعات مرفولوژی و مولکولی بسیار اندکی در ایران صورت گرفته است و در نظر گرفتن این نکته که در استان خراسان جنوبی مطالعه ای در این زمینه صورت نپذیرفته است، مطالعه حاضر به منظور بررسی وجود انگل های خونی در شترهای استان خراسان جنوبی با روش های انگل شناسی و مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش ها

محل نمونه گیری

استان خراسان جنوبی، در جنوب شرق ایران واقع شده و مساحتی بالغ بر 151 هزار کیلومتر مربع دارد و حدود 85 درصد از مساحت این استان را عرصه های

بیابانی تشکیل می‌دهد. میانگین بارندگی سالانه استان خراسان جنوبی، 134 میلی‌متر و میانگین دمای سالانه، 17/5 درجه سلسیوس است و به‌طور کلی دارای آب و هوایی گرم و خشک می‌باشد. این استان از سمت شرق هم مرز با کشور افغانستان بوده و از جنوب به استان سیستان و بلوچستان ارتباط دارد. به دلیل ویژگی‌های آب و هوایی و شرایط محیطی خاص این منطقه، مکان مناسبی برای پرورش و نگهداری شتر به عنوان حیوان بومی آن منطقه و همچنین وارداتی از کشور همسایه می‌باشد (11).

جمع‌آوری نمونه‌ها و آزمایش میکروسکوپی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، 200 نفر از شترهای استان خراسان جنوبی در فاصله زمانی فروردین تا آبان ماه سال 1399 به صورت اتفاقی انتخاب شدند و پس از پر کردن فرم پرسشنامه از صاحبان شترها، که حاوی سواباتی در خصوص سن، جنس، محل نگهداری شتر بوده، از ورید جاگولار آن‌ها در حدود 10 میلی‌لیتر خون گرفته شد و تا زمان شروع آزمایش در 20- درجه نگهداری شد. سپس از نمونه‌ها گسترش ضخیم و نازک تهیه، با تکنیک رنگ آمیزی گیمسا رنگ شد و در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

جداسازی DNA و روش PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Asia DENA ZIST) DNA و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس ODDNA استخراج شده توسط دستگاه نانو دراپدر طول موج 260-280 اندازه‌گیری و DNA تا هنگام استفاده در 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عملیات PCR با استفاده از پرایمرهای خاص هر گونه که جزییات آن در جدول شماره 1 نشان داده شده است، انجام شد. در روش مولکولی حجم کل نمونه‌ها 25 میکرو لیتر بوده است که متشکل از 12/5 میکرو لیتر Mastermix، 1 میکرو لیتر از هر پرایمر، 3 میکرو لیتر از

DNA استخراج شده و 7/5 میکرو لیتر آب مقطر استریل در یک میکرو تیوپ 0/2 استریل قرار داده و نهایتاً این میکرو تیوپ در دستگاه ترموسایکلر Bio-rad با برنامه به شرح زیر قرار گرفت. برنامه شامل یک چرخه 94°C به مدت 5 دقیقه (واسرشت اولیه) به دنبال آن 30-40 سیکل 94°C به مدت 1 دقیقه (واسرشت)، دمای اتصال به مدت 1 دقیقه 57°C برای تریپانوزوما اوانسی و بائریا بویس و بائریا بائریا بائریا 52°C به مدت یک دقیقه برای تریپانوزوما بروسه ای و تیلریا و مرحله طولی سازی به مدت 1 دقیقه 72°C برای همه انگل‌ها بود. مرحله طولی سازی نهایی یک سیکل 72°C به مدت 7 دقیقه در نظر گرفته شد. در نهایت لکتروفورز با استفاده از ژل اگارز 1/5 درصد برای ارزیابی مشاهده باندهای نشان دهنده محصولات PCR انجام شد.

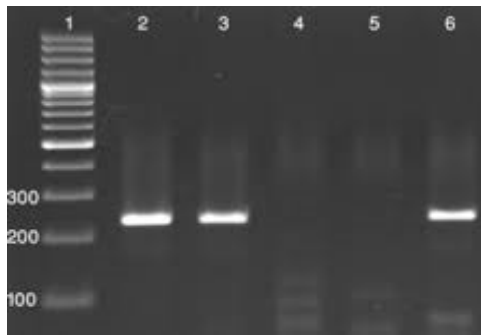
جدول شماره 1: پرایمر های اختصاصی تریپانوزوما اوانسی، تریپانوزوما بروسه ای، بائریا بویس، بائریا بائریا و جنس تیلریا

(Bp)	Nucleotidesquences ofprimers	Parasite
257	TR3: 5'-GCGCGGATTCCTTTCAGACGA-3' and TR4: 5'-TGCAGACACTGGAATGTACT-3'	<i>Trypanosomabrucei</i>
675	Bg3: TAGTTGTTATTTTCAGCCTC GCG and Bg4: AACATCCAAAGCAGCTAHTTAG,	<i>Babesia bigemina</i>
453	Bb1: TTTGGTATTGTCCTTGGTCAT and Bb2: ACCACTGTAGTCAAACCTACCC	<i>Babesia bovis</i>
1100	TheIF: 5'-AGTTTCTGACCT ATCAG-3' and TheIR: 5'-TTG CTTAAACTTCCTTG-3',	<i>Theileria sp.</i>
475	TBR1.2F: 5'-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3' and TBR1.2R: 5'-TTGCTGCGTCTTCAACGAA-3'	<i>Trypanosomaeuansii</i>

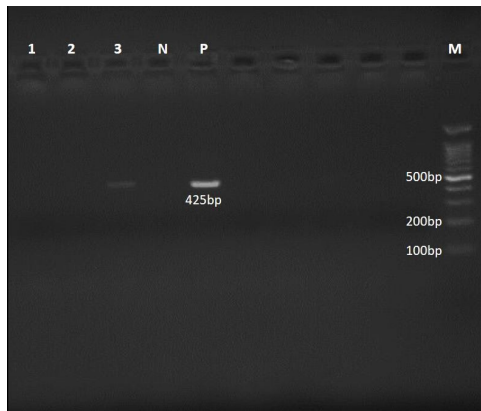
یافته‌ها

آزمایش میکروسکوپی

از مجموع 200 نمونه خون اخذ شده، 118 نمونه از شترهای ماده و 82 نمونه از شترهای نر اخذ گردید. در بررسی‌های میکروسکوپی پس از تهیه گسترش ضخیم و نازک از نمونه‌ها و رنگ آمیزی به روش گیمسا و بررسی با میکروسکوپ نوری تعداد 8 نمونه (4 درصد) از نظر حضور انگل تریپانوزوما مثبت بودند. در حالی که هیچ نمونه آلوده به تیلریا و بائریا مشاهده نگردید (جدول شماره 2).



تصویر شماره 1: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تریپانوزوم بروسه ای شماره 1 مارکر، شماره 2 کنترل مثبت، شماره 3 و 6 نمونه مثبت، شماره 4 و 5 نمونه منفی



تصویر شماره 2: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تریپانوزوما اوانسی: P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی، شماره 3: نمونه مثبت، شماره های 1 و 2: نمونه منفی و M: مارکر



تصویر شماره 3: درخت فیلوژنتیکی توالی های نوکلئوتیدی ژن 18S rRNA ایزوله تریپانوزوما اوانسی مطالعه حاضر همراه 26 ایزوله تریپانوزوما اوانسی ثبت شده در بانک ژنی

جدول شماره 2: آلودگی به انگل تریپانوزوم ها در شتر های استان

خراسان جنوبی بر اساس جنسیت

جنسیت	تعداد نمونه	مثبت مرغوبولوژی (تعداد (درصد))	مثبت مولکولی (تعداد (درصد))
ماده	118	6 (5/08)	8 (6/78)
نر	82	2 (2/44)	3 (3/65)
جمع	200	8 (4)	11 (5/5)

نتایج آزمایش مولکولی

نتایج مولکولی نشان داد که 6 نمونه (3 درصد)

دارای باندی در محدوده 475 جفت بازی و معرف حضور DNA انگل تریپانوزوما اوانسی بود. همچنین تعداد 5 نمونه (2/5 درصد) باند محدوده 257 جفت بازی نشان داده اند که بیانگر آلودگی به DNA انگل تریپانوزوم بروسه ای بوده است. در این مطالعه پس از انجام مراحل PCR باندی که بیانگر حضور انگل با بزی و تیلریا در این نمونه ها باشد دیده نشد (تصاویر شماره 1 و 2).

آنالیز فیلوژنی

ترسیم درخت با استفاده از روش

Maximum Likelihood با bootstrap 1000 در برنامه

MEGA نسخه 8 انجام شد. در این مطالعه، یک نمونه

مثبت تریپانوزوما اوانسی با شماره دسترسی MW425871

که در بانک جهانی ژن ثبت شد، برای تجزیه و تحلیل

فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه و

تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که تریپانوزوما اوانسی ایزوله

جدا شده در مطالعه حاضر در دسته اول (Clade 1) قرار

گرفت و قرابت ژنتیکی با تریپانوزوما اوانسی ژنوتایپ C

داشت (تصویر شماره 3).

بحث

ایران کشوری با شرایط اقلیمی متنوع است که

بخش های وسیعی از آن تحت تاثیر شرایط آب و هوایی

گرم و خشک می باشد، در نتیجه با توجه به جمعیت

ساکن در این مناطق و نیاز به سازگاری با چنین شرایط

جوی، شتر به عنوان حیوانی که سازگاری بسیار خوبی

جهت زندگی در چنین شرایطی را داراست، در کشور

حائز اهمیت است.

با توجه به اهمیت این حیوان در انتقال برخی از بیماری‌ها به سایر نشخوارکنندگان و انسان، بررسی راجع به بیماری‌های مشترک آن اهمیت می‌یابد (12). شترها در معرض انگل‌های مختلف خارجی و داخلی قرار می‌گیرند که خسارات اقتصادی قابل توجهی به بار می‌آورد و برخی از آن‌ها دارای اهمیت مشترک بین انسان و دام است، از جمله آن‌ها *تریپانوزوما اوانسی* می‌باشد. این انگل می‌تواند طیف وسیعی از پستانداران اهلی و وحشی را آلوده کند و در میزبانان متنوع خونگرم از جمله انسان دیده می‌شود (13). براساس مطالعه‌ای مروری که توسط Aregawi و همکاران در سال 2019 انجام شد، *تریپانوزوما اوانسی* به‌طور طبیعی در 48 کشور جهان گزارش شده است، که از این تعداد 20 کشور در آسیا، 17 کشور در افریقا، 7 کشور در آمریکای جنوبی و 4 کشور در قاره اروپا قرار داشتند (14).

نتایج حاصل از این مطالعه بر روی خون گرفته شده از 200 نفر شتر بیانگر آلودگی 3 درصد این شترها به *تریپانوزوما اوانسی* و 2/5 درصد آن‌ها به انگل *تریپانوزوما بروسه‌ای* می‌باشد. مطالعات مشابه انجام شده در سایر مناطق ایران نیز همچون سایر نقاط جهان آمارهای متفاوتی را بیان می‌کنند. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که شیوع *تریپانوزوما اوانسی* در مطالعه حاضر تقریباً مشابه با مطالعات انجام شده در مناطقی مانند مشهد (5/2 درصد)، نجف آباد اصفهان (1/07 درصد) و کرمان و استان سیستان و بلوچستان (0/5 درصد) می‌باشد (15-17). اما در برخی موارد شیوع بالاتری از *تریپانوزوما* هم از ایران گزارش شده است، به‌طوری‌که شیوع انگل در زابل توسط رنجبر و همکاران 19/47 درصد و زاکین و همکاران نیز شیوع 19 درصد آن را از جنوب شرق ایران گزارش نمودند (18، 19). میزان شیوع این انگل در سایر مناطق جهان بسیار متنوع است به طوری که از آلودگی 1 درصدی شترها در اسپانیا تا شیوع 56 درصدی در شترهای سودان گزارش شده است (20، 21).

در مورد *تریپانوزوما بروسه‌ای* مطالعات بسیار

محدودی در شتر سراسر جهان انجام شده است. El-Naga و همکاران در سال 2016 در کشور مصر مطالعه‌ای بر روی 331 شتر انجام داده‌اند، پس از بررسی‌های میکروسکوپی و مولکولی در 28 نمونه (12/61 درصد) آلودگی به *تریپانوزوما بروسه‌ای* را گزارش کردند (22). در مطالعه‌ای که توسط Diri و همکاران در سال 1989 در کشور سومالی انجام شد در حدود 0/03 نمونه‌های خون شتر آلودگی به *تریپانوزوما بروسه‌ای* را نشان داده‌اند (23). در مطالعه حاضر نیز 2/5 درصد نمونه‌های خون شتر آلوده به *تریپانوزوما بروسه‌ای* بودند. اگرچه به‌طور دقیق نمی‌توان به دلایل تفاوت در میزان شیوع انواع *تریپانوزوما*ها در شترهای سراسر جهان اشاره کرد، چرا که در هیچ‌یک از این مطالعات هدف بررسی چرایی و چگونگی آلودگی شترها به این انگل‌ها نبوده است (24). از جمله عواملی که در این مطالعات باعث این تفاوت شده است و می‌توان به هوایی آن توجه نمود محل زندگی حیوان، شرایط آب و هوایی مناطق، نحوه نمونه‌گیری، جغرافیای مورد بررسی و حتی تغذیه آن‌ها می‌باشد. به‌طور مثال در مطالعات انجام شده مشخص گردید که شترهای مورد بررسی که در اقلیم و شرایط متفاوتی رشد و پرورش یافته‌اند در دسترسی و یا عدم دسترسی ناقلین انگل *تریپانوزوما* به این حیوان همچنین جنسیت و حتی نوع تغذیه شتر نیز می‌تواند تاثیر بسزایی در شیوع متفاوت این انگل در شتر داشته باشد (25).

در مطالعه حاضر، هم در روش میکروسکوپی و هم در بررسی مولکولی هیچ موردی از آلودگی به *بازیلا* و *تیلریا* مشاهده نشد. این یافته در مطالعه حاضر تا حدودی با مطالعه ملکشاهی و همکاران همخوانی دارد. این محققین در مطالعه‌ای که در سال 1387 بر روی 150 نفر از شترهای کشتار شده شهرستان مشهد به منظور بررسی شیوع انگل‌های خونی در این حیوان انجام داده‌اند، در هیچ‌یک از نمونه‌ها *بازیلا* مشاهده نکردند و تنها یک مورد انگل *تیلریا* را در نمونه خون شتر گزارش کردند (15). اما یافته‌ها در مطالعه حاضر با مطالعه رنجبر و

همکاران مغایرت دارد. در مطالعه ای که این محققین در سال 1387 به منظور بررسی شیوع انگل های خونی در شترهای شهرستان زابل با استفاده از روش میکروسکوپی و مولکولی انجام داده اند، پس از بررسی نمونه های خون جمع آوری شده، از میان 72 نمونه، آلودگی به گونه های تیلریا در 6/2 درصد و آلودگی به انواع گونه های بابریا 3/45 درصد نشان داده شد (18). از جمله دلایل احتمالی عدم گزارش موارد مثبت پیروپلاسمیدا در مطالعه حاضر می توان به عدم دسترسی کافی ناقلین این دو انگل به شترها، شرایط بهداشتی مساعد محل نگهداری شترها، درمان دوره ای این حیوانات و مشکلاتی در روند تشخیص این انگل ها اشاره کرد. جهت تشخیص انگل های خونی به خصوص تریپانوزوم ها در شترها در مناطق مختلف جهان عمدتاً از 3 روش استفاده می گردد که شامل روش رایج انگل شناسی که همان بررسی میکروسکوپی است، روش سرولوژی و جستجوی آنتی بادی ضد تریپانوزوم ها در سرم و بالاخره روش مولکولی که از تکنیک های متنوع مولکولی جهت تشخیص تریپانوزوم مورد استفاده قرار گرفته است. از بین این روش ها، تشخیص مولکولی به دلیل حساسیت و ویژگی بسیار بالایی که دارند، قابلیت تشخیص دقیق موارد بدون علامت و خفیف آلودگی را داشته و می تواند در کنترل مخازن آلودگی و جلوگیری از انتشار آن به سایر گله ها موثر باشد.

ژن *ITS* (Internal Transcribed Spacer) ناحیه ای مناسب برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، ارزیابی روند تکاملی و همچنین تعیین تاکسونومی استفاده می شود. ناحیه *ITS* شامل دو ناحیه کوچک تر *ITS-1* و *ITS-2* می باشد (26). که بین نواحی تکراری هسته از جمله ژن های 18S rRNA و 5.8S قرار دارد. این ناحیه ژنی حدود 100 تا 200 کپی در ژنوم دارد. از این توالی ها می توان برای شناسایی تنوع بین گونه ای و حتی تنوع درون گونه ای در انگل ها و سایر پاتوژن ها استفاده کرد. اغلب داده های منتشر شده نشان می دهد که برای انجام مقایسه های بین گونه ای در انگل های تریپانوزوماتیده،

ناحیه *ITS-2* متغیر تر از نواحی *ITS-1* و 5.8S می باشد. پیش از این، Khuchareontaworn و همکاران (2007) پیشنهاد کردند که ناحیه ژنی *ITS-2* برای مشخص کردن تنوع ژنتیکی در گاومیش آبی بسیار کاربردی و مفید است (27).

همچنین عامر و همکاران (2011) نشان دادند که درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس توالی های نوکلئیدی ناحیه ژنی *ITS-2* می تواند در آشکارسازی و تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت شترهای مصر بسیار مثرتر باشد. این محققین نشان دادند که ایزوله های *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده از شترهای مصر در یک شاخه با دیگر *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده و *تریپانوزوما بروسه ای* قرار می گیرند و تنوع ژنتیکی زیادی مشاهده نشد (28).

در مطالعه حاضر با استفاده از ژن *ITS-2* و توالی ثبت شده *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده با کد TeIr119 و شماره دسترسی (MW425871) به همراه 26 توالی ثبت شده مشابه در بانک جهانی ژن برای ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شد. نتایج تعیین توالی و بلاست کردن، شباهت زیادی (100 درصد Identify & Query Cover) با *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده از شتر در زابل (KX900449)، شتر در عراق (MH571705)، شتر در شیراز (KX898421) را نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که *تریپانوزوما اوانسی* از میزبان های مختلف و منطقه جغرافیایی از نظر ژنتیکی متنوع است و می توان آن ها را به دو دسته اصلی طبقه بندی کرد (تصویر شماره 1) که ایزوله جدا شده در مطالعه حاضر در دسته اول (Clade 1) قرار گرفت. پورجعفر و همکاران طی ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از ژن *ITS-2* در *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده از شتر نشان دادند که تنوع ژنتیکی در بین ایزوله های جدا شده از شترهای ایران وجود دارد (29). به طور کلی باید در نظر داشت که تعداد قابل توجهی شتر به طور منظم از کشورهای همسایه مختلف وارد ایران می شوند، که ممکن است بر روی ناهمگنی و پویایی جمعیت های *تریپانوزوما اوانسی* در

ایران تاثیر مستقیم بگذارد. به نظر می‌رسد ظرفیت سریع و زیاد سازگاری این انگل با میزبانان و محیط‌های مختلف می‌تواند مربوط به تنوع ژنتیکی بالای آن در سراسر جهان باشد (30).

ساراتفان و همکاران (2007)، چهار ژنوتیپ خاص از *تریپانوزوما اوانسی* در شش میزبان مختلف (فیل، اسب، بوفالو، گاو، خوک و گوزن) براساس تکنیک PCR-RFLP از ژن انتقال دهنده گلوکز واقع شده در کروموزوم 10 این انگل گزارش کردند. با این حال، داده‌ها برای نشان دادن تنوع ژنتیکی این انگل در هر میزبان به طور جداگانه کافی نبودند (31).

در مطالعه حاضر نتیجه آنالیز فیلوژنی نشان داد که *تریپانوزوما اوانسی* جدا شده از خراسان جنوبی شباهت

100 درصد با ژنوتایپ A *تریپانوزوما اوانسی* ثبت شده در بانک جهانی ژن دارای قرابت بسیار زیادی می‌باشد. مطالعه حاضر، اولین مطالعه در زمینه بررسی میکروسکوپی و مولکولی عامل بیماری سورا در استان خراسان جنوبی می‌باشد. نتایج این مطالعه حاکی از شیوع نسبتاً قابل توجهی از *تریپانوزوما اوانسی* در شترهای منطقه شرق ایران است. بنابراین نتایج این مطالعه بر لزوم نیاز به یک سیستم نظارت دقیق و مطالعات ارزیابی به عنوان پیش‌نیاز اقدامات کنترل بیماری‌های انگلی خونی در شترهای خراسان جنوبی تأکید دارد. همچنین تحقیقات بیش‌تر با تمرکز بر ناقلین انگل *تریپانوزوما اوانسی* و بروسه‌ای و ارزیابی عوامل خطر آن مورد نیاز است.

References

1. Al-Rawashdeh OF, Sharif LA, Al-Qudah K, Al-Ani FK. Trypanosoma evansi infection in camels in Jordan. Revue Elev Med Vet Pays Trop 1999; 52(3/4): 233-238.
2. Desquesnes M, Holzmüller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR, Jittaplapong S. Trypanosoma evansi and surra: a review and perspectives on origin, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. BioMed Res int 2013; 2013: 194176.
3. Gutierrez C, Corbera JA, Juste MC, Doreste F, Morales I. An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with Trypanosoma evansi infection in dromedary camels in the Canary Islands. Vet Parasitol 2005; 130(1-2): 163-168.
4. Luckins AG. Protozoal diseases of camels. Proceedings of the First International Camel Conference, 2nd 6th. 1992: 23-27.
5. Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, et al. Human trypanosomiasis caused by Trypanosoma evansi in India: the first case report. Am J Trop Med Hyg 2005; 73(3): 491-495.
6. Powar RM, Shegokar VR, Joshi PP, Dani VS, Tankhiwale NS, Truc P, et al. A rare case of human trypanosomiasis caused by Trypanosoma evansi. Indian J Med Microbiol 2006; 24(1): 72-74.
7. Van Vinh Chau N, Buu Chau L, Desquesnes M, Herder S, Phu Huong Lan N, Campbell JI, et al. A clinical and epidemiological investigation of the first reported human infection with the zoonotic parasite Trypanosoma evansi in Southeast Asia. Clin Infect Dis 2016; 62(8): 1002-1008.
8. Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the Systematics. J Protozool 1964; 11(2): 200-207.
9. Steketee RW, Eckman MR, Burgess EC, Kuritsky JN, Dickerson J, Schell WL, et al. Babesiosis in Wisconsin: a new focus of disease transmission. JAMA 1985; 253(18): 2200-2207.

- 2675-2678.
10. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet res* 2009; 40(2): 37.
 11. Introduction of South Khorasan Province, Provincial Government of South Khorasan Province. 2017. Available at: <https://portal.sko.ir/ge-PortalOstan/fa/37/form/CI666/link>. Accessed May 2, 2021. (Persian).
 12. Anderson NE, Mubanga J, Fevre EM, Picozzi K, Eisler MC, Thomas R, et al. Characterisation of the wildlife reservoir community for human and animal trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(6): e1211.
 13. Pumhom P, Pognon D, Yangtara S, Thapratthorn N, Milocco C, Douangbouphe B, et al. Molecular prevalence of *Trypanosoma* spp. in wild rodents of Southeast Asia: influence of human settlement habitat. *Epidemiol Infect* 2014; 142(6): 1221-1230.
 14. Aregawi WG, Agga GE, Abdi RD, Büscher P. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasit Vectors* 2019; 12(1): 67.
 15. Malekshahi A, Aramon M, Sadr N, Saeidi F. Diagnosis study and evaluation of the prevalence of blood parasites in camels slaughtered in Mashhad in 2008. The first national congress of veterinary laboratory sciences. 2009.12.01.
 16. Mehrabiyan S, Mahzounieh M, Rabbani Khoorasgani M, Tahmasby H, Amiri Dehcheshmeh J, Ghorbani A, et al. Molecular detection of *Trypanosoma* from one-humped camels slaughtered in Najafabad slaughterhouse. *Biological Journal of Microorganisms* 2014; 3(10): 45-50 (Persian).
 17. Sazmand A, Eigner B, Mirzaei M, Hekmatimoghaddam S, Harl J, Duscher GG, et al. Molecular identification of hemoprotozoan parasites in camels (*Camelus dromedarius*) of Iran. *Iran J Parasitol* 2016 11(4): 568-573 (Persian).
 18. Ranjbar Bahadori, SH, Afshari moghadam, A. Study on the prevalence of blood parasites in camels of Zabol in 2008. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal* 2009; 3(2-10): 503-507. (Persian).
 19. Zakian A, Nouri M, Safaei P, Mohammad-Sadegh M, Kahroba H, Mokhber Dezfouli MR, et al. An acute outbreak of natural *Trypanosoma evansi* infection in camel (*Camelus dromedarius*) herds in the southwestern Iran. *Comparative Clinical Pathology* 2017; 26(1): 51-59.
 20. Molina JM, Ruiz A, Juste MC, Corbera JA, Amador R, Gutierrez C. Seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in dromedaries (*Camelus dromedarius*) from the Canary Islands (Spain) using an antibody Ab-ELISA. *Prev Vet Med* 1999; 47(1-2): 53-59.
 21. Boid R, El Amin EA, Mahmoud MM, Luckins AG. *Trypanosoma evansi* infections and antibodies in goats, sheep and camels in the Sudan. *Tropical Animal Health and Production* 1981; 13(1): 141-146.
 22. El-Naga TRA, Barghash S. Blood parasites in camels (*Camelus dromedarius*) in Northern West Coast of Egypt. *J Bacteriol Parasitol* 2016; 7(1): 1-7.
 23. Dirie MF, Wallbanks KR, Aden AA, Bornstein S, Ibrahim M. Camel trypanosomiasis and its vectors in Somalia. *Vet parasitol* 1989; 32(4): 285-291.

24. Cockrill WR. The Camelid: An All-purpose Animal. Scandinavian Institute of African Studies; 1984.
25. Eshetu Z, Desta B, Amare LB. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Jijiga administrative zone of the Ethiopian Somali region. *Global Veterinaria* 2013; 10(2): 233-238.
26. Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Dávila AMR, Grisard EC. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect Genet Evol* 2005; 5(1): 17-28.
27. Khuchareontaworn S, Singhapphan P, Viseshakul N, Chansiri K. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in buffalo based on internal transcribed spacer (ITS) regions. *Journal of Veterinary Medical Science* 2007; 69(5): 487-493.
28. Amer S, Ryu O, Tada C, Fukuda Y, Inoue N, Nakai Y. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. *Acta Trop* 2011; 117(1): 39-46.
29. Pourjafar M, Badii K, Sharifiyazdi H, Chalmeh A, Naghib M, Babazadeh M, et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* in Iranian dromedary camels. *Parasitol Res* 2013; 112(2): 899-903.
30. Averbek GA, Bjork KE, Packer C, Herbst L. Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. *J wildl Dis* 1990; 26(3): 392-394.
31. Sarataphan N, Boonchit S, Siriwan C, Indrakamhaeng P. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in Thailand based on a repeated DNA coding sequence marker. *Developing Methodologies for the Use of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomosis* 2007; 38(41): 81-92.