Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۳، ۲۵۳-۲۴۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,3: 249-253, 2015

شناسایی مولکولی گونه‌های تیلریا و ناقلین آن در گاوهای شهرستان یزد با روش Semi-nested PCR

صغری خدابنده[1] غلامرضا رزمی[2]*
۱) دانش آموخته انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد-ایران
۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد-ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ آذر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۹ بهمن ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: تیلریوز یکی از بیماریهای تک یاخته‌ای خونی در گاو بوده که سبب مرگ و میر بالا می‌شود. تاکنون مطالعات میکروسکوپی زیادی درباره شناسایی گونه‌های آلوده کننده تیلریادر گاو و کنه‌های ناقل صورت گرفته که در مقایسه با روش‌های مولکولی از حساسیت و ویژگی کمی‌برخوردارند. **هدف:** دراین مطالعه سعی شدگونه‌های تیلریاوناقلین آن درگاوهای شهرستان یزدباروشSemi-nested PCR موردشناسایی قرارگیرند. **مواد و روش کار:** طی ماههای خرداد تا شهریور سال ۱۳۹۱، تعداد ۱۰۰ نمونه خون EDTA به همراه گسترش‌های نازک خون ازگاوهای شیری نژاد هلشتاین مشکوک به تیلزیوز بدون سابقه واکسیناسیون بر علیه بیماری تهیه گردید. همزمان با بازرسی بدن گاوها تعداد ۲۴۹ عدد کنه جمع آوری شدندگسترش تهیه شده با گیمسا رنگ آمیزی شدندو DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت تجاری استخراج گردیدند. کنه‌ها همچنین با استفاده از کلیدهای تشخیص شناسایی و بر اساس جنس و گونه کنه به ۵۰ مجموعه ۵ کنه‌ای تقسیم شدند و بااستفاده از لوپ و وسایل حشره شناسی غدد بزاقی آنها جدا سازی و DNA آنها نیز استخراج گردید. نمونه‌های DNA استخراج شده با آن-Semi nested PCR بر روی ژنrRNA ۱۸S، مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت تشخیص تیلریا لستو کاردی و تفریق آن از تیلریا \ تولاتادر نمونه‌های کنه از روش PCR-RFLP استفاده شد. **نتایج:** در بررسی اولیه انجام شده با میکروسکوپ نوری، در ۴ گسترش خونی (۴٪) اشکال حلقوی انگل مشاهده گردید. همچنین همه کنه‌های جمع آوری شده هیالوما \ آناتولیکوم \ آناتولیکوم تشخیص داده شدند. نتایج به دست آمده با روش -Semi nested PCR، نشان دهنده آلودگی ۱۱ نمونه خون (۱۱٪) و سه مجموعه غدد بزاقی کنه به تک یاخته تیلریا \ تولاتا بودند. هیچ یک از نمونه‌ها آلوده به تیلریا \ وارینتالیس نبودند. مطالعات تکمیلی با PCR-RFLP با استفاده از آنزیم MspI نیز نشان داد که نمونه‌های کنه‌ها همگی از نظر آلودگی به تیلریا لستو کاردی منفی می‌باشند. **نتیجه گیری نهایی:** بر پایه نتایج بدست آمده تیلریا \ تولاتا و کنه هیالوما \ آناتولیکوم \ آناتولیکوم عامل و ناقل مهم تیلریوز گرمسیری در شهرستان یزد می‌باشند..

واژه‌های کلیدی: تیلریا، گاو، Semi-nested PCR

مقدمه

تیلریوزدر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری جهان بروز می کنند و باعث خسارات اقتصادی فراوانی می‌شوند. تیلریا \ تولاتا و تیلریا پارو \ مهمترین گونه‌های مسئول تلفات و کاهش تولید در گاوهای شیری می‌باشند. تیلریا \ تولاتا گستردگی جغرافیایی بالایی دارد و در اروپای جنوبی، ساحل مدیترانه، خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیا مشاهده می‌شود. تیلریا پارو \ در افریقای شرقی و مرکزی پراکنده است. تیلریا \ وارینتالیس گونه دیگری است که در سرأسر جهان پراکنده است و نسبت به تیلریا \ تولاتا و تیلریا پارو \ غیر بیماریزا بوده، اگرچه مواردی از بیماری ناشی از این گونه در کشور ژاپن با تب، کم خونی و بی اشتهایی همراه است (۹،۱۴). تیلریا \ تولاتا عامل تیلریوز گاوهای مناطق مختلف ایران را آلوده نموده و با علائم تب، بزرگی غدد لنفاوی، کم خونی پیشرونده، زردی، بیقراری، بی اشتهایی، خشن شدن پوشش مویی، تورم ریه، تنگی نفس، اختلال در هضم و زخم‌های شیردانی دیده می‌شوند بیماری در ایران توسط کنه‌های هیالوما \ آناتولیکوم \ آناتولیکوم، هیالوما \ آناتولیکوم \ اکسکاواتوم، هیالوما \ آیاتیکوم \ آیاتیکوم، هیالوما درومدری و هیالوما دتریتم انتقال می‌یابند(۴). تیلریا \ وارینتالیس گونه دیگری است که در گاوهای استان‌های مازندران و استان گلستان نیز گزارش شده است(۲،۴). تشخیص گونه‌های تیلریا معمولاً بر پایه تشخیص مورفولوژی انگل در گسترش‌های رنگ آمیزی شده خون می‌باشد (۱۴). گونه‌های مختلف تیلریا از لحاظ مورفولوژی شبیه بوده و تشخیص تفریقی این گونه‌ها بخصوص در دام‌های حامل با پارازیتمی‌پایین آسان نمی‌باشد. بهمین دلیل امروزه از روش‌های ملکولی بدلیل حساسیت بالا جهت تفریق گونه‌های تیلریا استفاده می‌گردد(۳). شهرستان یزد با آب و هوای گرم و خشک واجد تعداد قابل توجهی گاو شیری حدود ۱۴۲۰۰ رأس می‌باشد. طبق گزارشات بالینی دامپزشکان شهرستان، تیلریوز گاوی هرساله با شیوع نسبتاً بالا مشاهده می‌شود ولی تاکنون مطالعه در باره تیلریوز گاوی در این شهرستان انجام نشده است. دراین مطالعه تلاش شد تا گونه‌های تیلریا و ناقلین آن در گاوهای این شهرستان با روش Semi-nested PCR مورد شناسایی قرار گیرند.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۱-۳۸۷۶۳۸۵۱ نمابر: ۰۵۱-۳۸۷۶۳۸۵۲ Email: Razmi@um.ac.ir

www.SID.ir

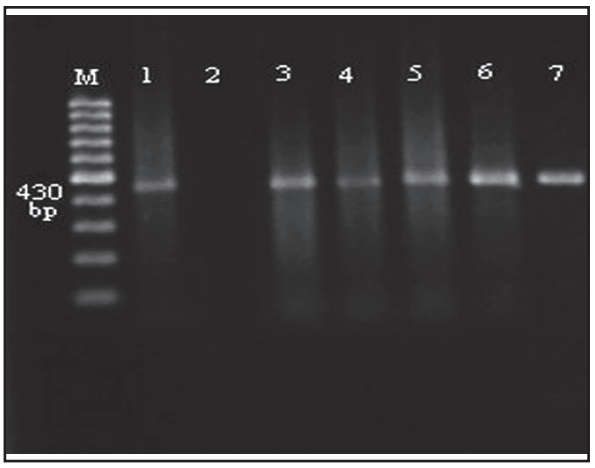
Archive of SID

مواد و روش کار

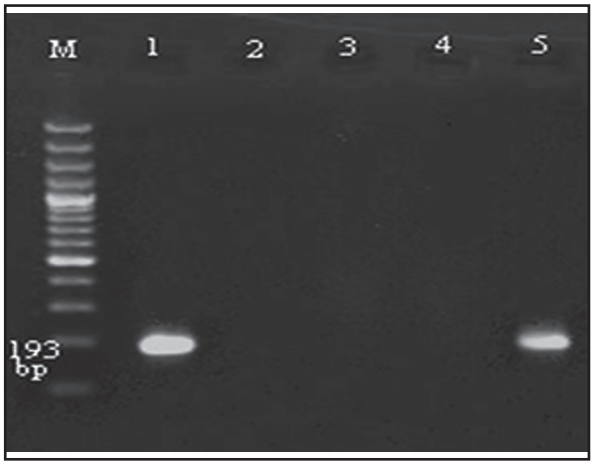
طی ماه‌های خرداد تا شـهریور سـال ۱۳۹۱، پس از هماهنگی با اداره دامپزشـکی شهرسـتان یزد، خونگیری از تعداد ۱۰۰ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین به ظاهر سالم از دامداری‌های با سابقه تیلریوز انجام گرفت. پس از ثبت مشـخصات گاوها از گاوهای مشـکوک و غیر واکسـینه بر علیه تیلریـا پـس از و ضدعفونی کردن محـل تزریق، از ورید وداج به میزان ۳mL خون گرفته و به لوله حاوی EDTA انتقال داده شد. همزمان از ورید مارژینال گوش نیز گسـترش نازک تهیه گردید. در مرحله آخر بدن گاوها بازرسـی و کنه‌ها از روی دام جمع آوری شـد. نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشـگاه دانشکده انتقال داده شـد و در دمای ۲۰°C – تا زمان انجام آزمایش نگه داری گردید. در آزمایشـگاه گسـترش‌های خونی را با متانول ثابت کرده و با گیمسای رنگ آمیزی شدند. گسترش‌های خونی از نظر وجود پیروپلاسم‌های تیلریا با استفاده از میکروسکوپ نوری با عدسی روغنی مورد بررسـی قرار گرفتند. جنس و گونه‌های کنه‌های جمع آوری شده بر اساس بر اسـاس کلیدهای تشخیص تعیین شـدند (۱۹). آنگاه کنه‌ها را بر اساس جنس و گونه به دسته‌های ۵ تایی تقسیم و شماره گذاری شدند. و با استفاده از لوپ و پنس وقیچی حشره شناسی غدد بزاقی خوشه انگوری هر دسته کنه جدا و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۰µL سـرم فیزیولوژی منتقل شدند میکروتیوب‌ها دردمای ۲۰°C – تا زمان اسـتخراج DNA نگهداری شدند. اسـتخراج DNA نمونه‌های خون و غدد بزاقی با اسـتفاده از کیت تجاری (MBST، تهران) بر اسـاس دسـتورالعمل شرکت سـازنده انجام گرفت. نمونه‌های DNA اسـتخراج شـده با روش semi nested PCR با روش Shayan&Rahbari صـورت گرفت (۲،۱۳). در مرحله اول روش semi nested PCR با استفاده از این پرایمرها یونیورسال نمونه از لحاظ آلودگی تیلریا و بابزیا از هم تفکیک می‌شـوند. محصول PCR مربوط به بابزیا بر روی ژل آگاروز ۱/۷ ٪ بانـدی با سـایز bp ۴۰۲–۳۸۹ و در محصول PCR مربوط به تیلریا باندی با سـایز bp۴۳۰–۴۲۶ را تشکیل می‌دهند. در مرحله دوم محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به تیلریا آنولاتا سـایز باند bp ۱۹۳ و مربوط به تیلریا اورینتالیس bp ۲۳۵ خواهد بود. در هر PCR حداقـل یک تیوب واجد خون غیر آلوده بعنوان کنترل منفی و خون آلوده بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید. با توجه به تشابه ملکولی تیلریا آنولاتا با تیلریا لستو کاردی برای تفریق این دو تک یاخته، محصول PCR در مرحله اول توسـط آنزیـم MspI طی واکنش RFLP مـورد هضم آنزیمی با متد Spitalska و همکاران در سال ۲۰۰۴ قرارگرفت (۱۵). این آنزیم محصول DNA مربوط به تیلریا آنولاتا را برش نمی‌دهد ولی DNA مربوط به تیلریا لسـتو کاردی را برش می‌دهد. نتایج بدست آمده در دو روش میکروسکپی وملکولی با آزمون مک نمار (MacNemar's Test)– مورد آزمون آماری قرار گرفت.

جدول ۱. مقایسـه فراوانی آلودگی تیلریا آنولاتا با دوروش میکروسکپی و ملکولی در گاوهای شهرستان یزد.

		روش میکروسکپی		تعداد کل
		مثبت	منفی	
روش ملکولی	مثبت	۴	۷	۱۱
	منفی	۰	۸۹	۸۹
تعداد کل		۴	۹۶	۱۰۰



تصویر ۱. آنالیز تکثیر DNA اسـتخراج شـده در مرحله اول Semi nested-PCR M : مارکـر DNA (bp۱۰۰). بـاز، چاهک ۱: کنترل مثبت تیلریا، چاهک ۲ : منفی تیلریا، چاهک ۷-۳ : نمونه‌هایی که تیلریا مثبت شده‌اند.



تصویر۲. تکثیر DNA اسـتخراج شـده در مرحله دوم Semi nested-PCR : M : مارکـر DNA (bp۱۰۰). باز، چاهک ۱: کنترل مثبت تیلریا آنولاتا، چاهک۲: کنترل منفی تیلریا آنولاتا، چاهک ۳۰-۴ : نمونه‌های منفی خون و نمونه ۵ نمونه مثبت.

نتایج

ازمجمـوع ۱۰۰ گاو خونگیری شـده، در(۴٪)۴ گسـترش‌های خونی آلودگی به تک یاخته تیلریا آنولاتا مشـاهده شد، در حالیکه با روش semi nested PCR در (۱۱٪) ۱۱ نمونه‌هـای خـون، آلودگـی به تیلریا آنولاتا تعیین گردید(تصاویر ۱،۲).آزمون آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج بدست آمـده توسـط دو روش را تأیید نمـود. (جـدول ۱).($p>0/05$) در هیچ یک از نمونه‌هـا آلودگی به تیلریا اورینتالیس تعییـن نگردید. از تعداد ۲۴۹ کنه

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری شـده (۱۹۴ کنه نر و ۸۵ کنه ماده)، همگی هیالوما \آناتولیکم \آناتولیکم تشـخیص داده شـدند. نتایج ملکولی بر روی ۵۰ مجموعه غدد بزاقی کنه، نشـاندهنده آلودگی سـه مجموعه از آنها به تیلریا \تولاتا بود. آزمایش تکمیلی PCR-RLFP نیز عدم آلودگی نمونه‌های مثبت غددبزاقی کنه‌ها را به تیلریا لستو کاردی را تأیید نمود.

بحث

بر اسـاس مطالعات انگل شناسی و مشـاهدات بالینی دو گونه تیلریا \تولاتا و تیلریا \وریتنالیس در ایجاد آلودگی تیلریایی درگاوهای ایران نقش دارند (۴). اکثر مطالعات صورت گرفته در زمینه شناسـایی گونه‌های تیلریا گاو در ایران بر اساس مشخصات مرفولوژیکی دربررسی میکروسکوپی بوده که از حساسـیت و ویژگی کمی‌در برابر روش مولکولی برخوردار اسـت. در این بررسـی از دو روش میکروسکپی و ملکولی جهت تشخیص گونه‌های تیلریا گاوی اسـتفاده شد و آلودگی تیلریا \تولاتا با روش میکروسکوپی در ۴٪ گاوها ی شهرسـتان تعیین گردید. میزان آلودگی بدست آمده در این مطالعه در مقایسـه با نتایج بدست آمده توسـط Morchedi و همکاران در سـال ۱۳۸۲ با گزارش آلودگی تیلریـا \تولاتا به میزان ۱۵٪ در گاوهای شهرستان ارومیه (۷) و مطالعه Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۹ با گزارش آلودگی به انگل تیلریا \تولاتا به میزان ۲۰٪ در گاوهای شهرسـتان مشهد (۱۱) کمتر بوده در حالیکه با نتایج Shahgholian و همکاران در سـال ۲۰۰۳ در شهرکرد با تعیین ۴/۹ ٪ آلودگی تیلریایی در گاوها (۱۲) و مطالعه Mozafari و همـکاران در سـال ۲۰۰۸ با تعییـن فراوانی تیلریوز گاوی در ۵/۶٪ گاوهـا شهرسـتان زاهدان همخوانـی دارد (۸). در این مطالعه آلودگی گاوها به تیلریا \تولاتا در ۱۱٪ نمونه‌ها با روش PCR تعیین شدند. آنالیز آماری حساسـیت بالاتر این روش را در مقایسه با روش میکروسکی نشـان داد. تاکنون مطالعات اندکی در باره آلودگی تیلریا در گاوهای ایران با روش ملکولی صورت گرفته اسـت.Azizi و همکاران در سـال ۲۰۰۷، ۱۴۰ رأس گاو بالای ۱ سـال را در شهرکرد از نظر آلودگی به تیلریا \تولاتا مورد بررسـی قرار دادند. میزان آلودگی به تیلریـا \تولاتا با روش PCR به میزان ۴۰٪ تعیین نمودند (۱). Hoghooghi-Rad و همکاران در سـال ۲۰۱۱ با روش ملکولی مشابه این مطالعه در ۷/۵٪ گاوها ی استان گلستان آلودگی به تیلریا \تولاتا را مشخص نمودند.(۵). در مطالعه حاضر آلودگی به تیلریا \وریتنالیس در گاوهای استان یزد مشاهده نگردید. بنظر می‌رسد این گونه فقط در اسـتان‌های حاشـیه دریای مازندران دیده می‌شود (۴) در تنها مطالعه ملکولی انجام شـده توسط Ghaemi و همکاران درطی سال‌های ۲۰۱۱ از ۱۶۰ نمونـه خونی جمع‌آوری شـده از گاوهای به ظاهر سـالم در اسـتان گلستان در شمال ایران و با استفاده از روش Seminested-PCR در ۵/۶۲٪ گاوها آلودگی به انگل تیلریا \وریتنالیس و ۷/۵٪ گاوها آلودگی به انگل تعیین نمودند (۲). در بررسی حاضر تمام کنه‌های جمع‌آوری شده کنه هیالوما \آناتولیکوم تشخیص داده شدند و همچنین آزمایش PCR آلودگی غدد بزاقی کنه‌ها را به تیلریا \تولاتا تأیید نمود. مطالعات انجام یافته در ایـران نیز براهمیت کنه هیالو ما \آناتولیکم در انتقال تیلریا \تولاتا تأکید دارد(۴). Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعداد ۶۸۰ کنه از ۱۰۲ گاوهای مشکوک به تیلریا در شهرستان مشهد جمع آوری کردند که ۹۲٪ کنه‌ها هیالوما \آناتولیکم \اکسـکاواتوم تشخیص داده شـدند و همچنین این کنه بعنوان ناقل اصلی تیلریا \تولاتا با رنگ آمیزی غددبزاقی و مشاهده آلودگی تعیین گردید (۱۰). Tavassoli و همکاران در سال ۲۰۱۱ در غرب و شمال غـرب ایـران از ۲۳۷ گاو آلوده به تیلریا \تولاتا تعـداد ۴۰۲ کنه جدا کردند کـه پس از آزمایش بـا روش PCR، ۳۹/۹٪ از کنه‌های هیالوما \آناتولیکوم \آناتولیکـوم، ۱۸/۲٪ از کنه‌های هیالوما \آناتولیکوم \اکسـکاواتوم و ۳/۵٪ از کنه‌های هیالوما \آسیاتیکوم \آسیاتیکوم آلوده به انگل تیلریا \تولاتاتشخیص دادند. این نتیجه نشان داد که هیالوما \آناتولیکوم \آناتولیکوم نقش اصلی را در انتقال تیلریا \تولاتادر ایران بازی می کند(۱۶). کنه هیالوما \آناتولیکوم بعنوان ناقل مشـترک تیلریا \تولاتا و تیلریا لستو کاردی شناخته می‌شود و امکان آلودگی گاوها به تیلریا لستو کاردی نیز وجود دارد (۶). از آنجاییکه به علت شباهت بسیار زیاد سکانس نوکلئوتیدی این دوگونه، امکان تفریق دوگونه با اسـتفاده از پرایمرهای استفاده شـده در روش PCR حاضر وجود ندارد. بـه همین دلیل نمونه‌های مثبت، با روش PCR – RLFP مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۵). که نتایج بدست آمده موید عدم آلودگی نمونه DNA استخراج شـده از غدد بزاقی کنه‌ها به تیلریا لستو کاردی بودند. با توجه به نتایج این مطالعه اهمیت گونه تیلریا \تولاتا و کنه هیالو ما \آناتولیکم \آناتولیکم بعنوان عامل و ناقل بیماری در گاوهای شهرستان یزدمورد تأیید قرار می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

از آقای عشـرتی کارشناس بخش انگل شناسی بخاطر همکاری در انجام آزمایشPCR تشکر می‌گردد. از شبکه دامپزشکی شهرستان یزد که زمینه نمونه برداری از گاوهای شـیری را فراهم آوردند، قدردانی می‌گردد. این پایان نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشـی دانشـگاه فردوسی انجام گرفت، از معاونت وهمکاران ایشان قدردانی و تشکر می‌شود.

References

1. Azizi, H., Shiran, B., Farzaneh-Dehkordi, A., Salehi, F., Taghadosi, C. (2007) Detection of *Theileria annulata* by PCR and its comparison with smear method in native carrier cows. Biotechnology. 7: 574-577.
2. Ghaemi, P., Hoghooghi-Rad, N., Shayan, P., Eckert, B. (2011) Detection of *Theileria orientalis* in

www.SID.ir

Archive of SID

Iran by semi-nested PCR. Parasitol Res. 10: 1-5.
3. Gubbels, J.M., de Vos, A,P., Vader weid, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F. (1999) Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. J Microbiol. 37: 1782-1789.
4. Hashemi-Fesharaki, R. (1986) Bovine theileriosis in Iran. Arch Razi Inst. Razi Institue Pub (1st ed.) Karaj-Iran.
5. Hoghooghi-Rad, N., Ghaemi, P.,Shayan, P., Eckert, B., Sadr-Shirazi, N. (2011) Detection of native carrier cattle infected with *Theileria annulata* by Semi-bested PCR and smear method in golestan province of Iran. World Appl Sci J. 12: 317-323.
6. Leemans, I., Brown, D., Hooshmand-Rad, P., Kirvar, E., Uggla, A. (1999) Infectivity and cross-immunity studiesof *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: I. In vivo responses. Vet Parasitol. 82: 179-192.
7. Morshedi, A., Horr-Yadollahi M.R., Tavassoli, M., Dalir-Naghade, B. (2003) A seroprevalence survey of *Theileria* infection by ELISA, compare with blood-smear observation in cattle. J Fac Vet Med Uni Teh. 58: 319-22.
8. Mozafari, A., Noorollahifard, S., Mohammadi, V. (2008) A survey of bovine theileriosis in Zahedan cattles. Iran Vet J. 3: 67-70.
9. Radostis, O.M., Gay, C.C., Hinchliff, K.W., Constable, P.D. (2007)Veterinary Medicine (10th ed.) W.B. Saunders. London, UK.
10. Razmi, G.R., Ebrahimzadeh. E., Aslani, M.R. (2003) A study about tick vectors of bovine theileriosis in an endemic region of Iran. J Vet Med (B) Infect Dis. 50: 309-310.
11. Razmi, G.R., Barati, F., Aslani, M.R. (2009) Prevalence of *Theileria annulata* in dairy cattle in Mashhad area, Iran. J Vet Parasitol. 23: 81-83.
12. Shahgholian, L., Meshki, B., Momtaz, H., Samipour, V. (2003) A survey of prevalence of bovine theileriosis in shahrekord.Pajohesh va Sazandegi. (In persian). 59: 41-43.
13. Shayan, P., Rahbari, S. (2005) Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. Parasitol Res. 97: 281–286.
14. Soulsby, E.J.L. (1982) Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals (7th ed.) Bailliere-Tindal. London, UK.
15. Spitalska, E., Torina, A., Cannella, V., Caracappa, S., Sparagano, O.A. (2004) Discrimination between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene. Parasitol Res. 94: 318-320.
16. Tavassoli, M., Tabatabaei, M., Esmaeilnejad, B., Hasani-Tabatabaei, M., Najafabadi, A., Pourseyed, S.H. (2011) Detection of *Theileria annulata* by the PCR-RFLP in ticks (Acari, Ixodidae) collected from cattle in West and North-West Iran. Acta Parasitol. 1: 8-13.
17. Walker, A., Camicas, J., Bouattour, A., Estrada-pana, A. (2004) Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region (1st ed.) University of Zaragosa. Zaragosa, Spain.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular detection of *Theileria* species and its vectors in cattles in Yazd area by semi-nested PCR method

Khodabandeh, S.[1], Razmi, Gh.[2*]

[1]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran*

(Received 9 December 2014, Accepted 18 Februry 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Theileriosis is a blood protozoan disease with high mortality in cattle in tropical and subtropical regions of the world. Several studies were conducted to identify *Theileria* species in infected cattles and vector ticks by microscopic examination. However, microscopic technique has lower sensitivity compared to molecular method. **OBJECTIVES:** This study was carried out to identify *Theileria* species and its carriers in cattles of Yazd city, sing semi nested PCR. **METHODS:** Between June to September of 2012, 100 EDTA blood samples and 249 ticks were collected from Holstein breed with no history of vaccination against the ileriosis in Yazd area. The collected samples were transported to the laboratory, then prepared the blood smears and stained with Giemsa method. Also, the collected ticks were separated into 50 tick pools, according to their species. Then their salivary glands were removed using stereomicroscope in 0.85% saline. DNA of blood and salivary glands was extracted using a commercial kit and analyzed by Semi-nested PCR. PCR-RFLP was also used to differentiate *Theileria lestoquardi* from *Theileria annulata* in positive samples of ticks. **RESULTS:** Ring forms of *Theileria* spp. were found in 4 (4%) of blood smears. All ticks were *Hyalomma a.anatolicum*. Results of PCR were indicated that 11 (11%) of blood samples and three pools of tick's salivary glands were infected with Theileria. *Theileria annulata* were only detected in all positive samples by Semi-nested PCR. The results of PCR-RFLP using MspI enzyme showed that the tick's salivary glands were negative to *Theileria lestoquardi* infection. **CONCLUSIONS:** Based on the results, it is concluded that *Theileria annulata* and *Hyalomma a.anatolicum* are important agent and vector tick of tropical theileriosis in dairy cattles of Yazd area.

Keyword: cattle, semi-nested PCR, *Theileria* spp

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Frequency of *T.annulata* infection by two methods (microscopy and molecular) in Yazd area.

Figure 1. The Seminested-PCR amplified products in first round: Lane (M), 100 bp DNA ladder marker; lane 1, positive control (430 bp); Lane2, Negative control, lane 3-7: positive samples.

Figure 1. The Seminested- PCR amplified products in second round: Lane (M), 100 bp DNA ladder marker; lane 1, positive control (193 bp); Lane2, Negative control; lane 3-4: negative samples; lane: positive sample.

***Corresponding author's email: razmi@um.ac.ir, Tel: 051-38763852, Fax: 051-38763851**

www.SID.ir