نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۲): ۱۰۷-۱۱۲.

شناسایی *تیلریا آنولاتا* از گاوهای مشکوک به تیلریوز در استان قزوین با آزمایش‌های میکروسکوپی و PCR

مونا حسن‌زاده[۱*]، لیدا عبدالمحمدی خیاو[۲]

۱. کارشناسی ارشد انگل‌شناسی بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران- ایران.
۲. دانش‌آموخته دکتری تخصصی باکتری شناسی بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران- ایران.

دریافت: ۲۲ شهریورماه ۱۳۹۹ **پذیرش:** ۱۶ خردادماه ۱۴۰۰

چکیده

تیلریوز گاوی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در ایران است که باعث ضرر و زیان اقتصادی به صنعت دامپروری با کاهش وزن، کاهش شیر و افزایش مرگ و میر می‌شود. عامل بیماری *تیلریا آنولاتا* بوده که از طریق کنه جنس هیالوما منتقل می‌گردد. تشخیص تیلریوز عمدتاً بر اساس علایم بالینی و آزمایش میکروسکوپی است. امروزه برای تشخیص قطعی از آزمون مولکولی PCR استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت تیلریوز گاوی، هدف از این پژوهش تشخیص موارد *تیلریا آنولاتا* از گاوهای مشکوک به تیلریوز در استان قزوین با روش مشاهده میکروسکوپی و PCR بود. از مجموع ۶۸ راس گاو دارای علایم بالینی خون‌گیری به عمل آمد. از نمونه‌های خون اسمیر تهیه و به روش گیمسا رنگ آمیزی شد. نمونه‌های مثبت برای تشخیص مولکولی بررسی شدند. از نمونه‌های خون با روش فنل کلروفرم DNA استخراج شد و آزمون PCR توسط پرایمرهای 18s rRNA، Tams انجام شد، سپس محصول PCR یک نمونه تعیین توالی شد. بر اساس نتایج به دست آمده *تیلریا آنولاتا* در گسترش خون ۲۸ (۴۱/۱۸ درصد) نمونه از ۶۸ نمونه خون با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید، درحالی که تمام نمونه‌ها در آزمون PCR مثبت بودند. آنالیز بلاست بر اساس توالی ژن 18S rRNA در یک جدایه ایرانی ۹۹/۱ درصد تشابه نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، *تیلریا آنولاتا* شیوع بالایی در گاوهای استان قزوین دارد. پیشنهاد می شود مطالعات بیشتر در این زمینه برای ارزیابی صحیح‌تر بیماری در ایران صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص مولکولی، *تیلریا آنولاتا* ، قزوین، گاو.

مقدمه

تیلریوز، بیماری انگلی تک‌یاخته‌ای از شاخه اپی-کمپلکسا (Apicomplexa)، راسته پیروپلاسمیدا (Piroplasmida) و خانواده تیلریده (Theileridae) و جنس تیلریا است که به وسیله کنه‌های ایکسودیده در سم‌داران وحشی و اهلی سبب ایجاد بیماری تیلریوز می‌گردد (۲۴)؛ اهمیت بیماری‌زایی این تک‌یاخته در نشخوارکنندگان نظیر گاو گوسفند و بز بیشتر از سایر میزبان‌هاست گونه‌های مهم تیلریا در گاو شامل *تیلریا پاروا*، *تیلریا آنولاتا*، *تیلریا اورینتالیس*، *تیلریا سرژانی*، *تیلریا موتانس*، *تیلریا ولیفرا* و *تیلریا تاروتراجی* هستند. در این میان دو گونه مهم شامل *تیلریا پاروا* عامل تب سواحل شرقی (East Coast Fever) و *تیلریا آنولاتا* عامل تیلریوزیس گرمسیری (Tropical Theileriosis) هستند. علی‌رغم تلفات نسبتاً کمترگونه *تیلریا آنولاتا* نسبت به تیلریا پاروا، ولی احتمال واگیری بالا و آلودگی طولانی به صورت حامل، اهمیت بررسی این تک یاخته را خاطر نشان می‌کند (۲۷). بیماری تیلریوز با علایم تب، بزرگی غدد لنفاوی، آنمی پیش‌رونده، زردی، بی‌قراری و بی‌اشتهایی مشخص می‌شود (۱۷). معمولا به منظور تشخیص گونه-های تیلریا از مشاهده میکروسکوپی خون با رنگ آمیزی گیمسا استفاده می‌گردد (۲۳). تشخیص میکروسکوپی تیلریا به دلیل شباهت گونه‌ها مشکل است، همچنین این آزمون نسبت به روش‌های دیگر حساسیت و ویژگی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: muna1361@gmail.com

کمتری دارد، لذا از آزمون‌های دیگر نظیر آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی به منظور تشخیص استفاده می-گردد. تیلریوز در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۱۴ با ورود ۱۶ راس گاو از فرانسه و تلف شدن ۱۲ راس از آن‌ها جلب توجه کرد. از سال ۱۳۱۵ پژوهش در باره شناسایی عامل بیماری شروع شد و تیمی به سرپرستی دلپی مشخص کردند که عامل تیلریوز حاد در ایران *تیلریا آنولاتا* است (۱۰). در ایران این بیماری به صورت اندمیک در گاو و گوسفند گزارش شده است (۲۸). Bazargani و همکاران در سال ۱۳۶۶ میزان آلودگی به تیلریوز در گاوهای استان تهران را در ۹۵ رأس گزارش کردند (۴). Khodabandeh و همکاران میزان آلودگی به *تیلریا آنولاتا* را به روش مولکولی در شهرستان یزد ۱۱ درصد (۱۴) و Hoghooghi-Rad و همکاران در استان گلستان، ۷/۵ درصد گزارش کردند (۱۲)، درحالی که در بررسی Azizi و همکاران در شهرکرد میزان آلودگی به همین روش ۴۰ درصد مشخص گردید (۳). Hajihassani و همکاران در بررسی خود نشان دادند، میزان آلودگی دراستان کردستان تقریبا به همین میزان (۴۴/۲ درصد) بود (۹) . تاکنون مطالعه ای در زمینه شناسایی گونه تیلریا در گاو در استان قزوین صورت نگرفته است، لذا هدف از این مطالعه، بررسی میزان آلودگی به تیلریا آنولاتا در گاوهای مشکوک به تیلریوز در استان قزوین با روش‌های مشاهده میکروسکوپی و بررسی مولکولی دو ژن 18S rRNA وTams (Theileria annulata merozoite surface antigen) است.

مواد و روش کار

در فصول بهار و تابستان از ۶۸ راس گاو دارای علایم بالینی مشکوک به تیلریوز (بالا رفتن درجه حرارت، تورم غدد لنفی، نبود اشتها، تغییر رنگ مخاط چشم، لاغری مفرط، کم خونی) نمونه گیری انجام شد. پس از ثبت مشخصات دام‌ها محل تزریق ضدعفونی شده و از ورید مارجینال گوش و همچنین ورید وداجی خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون از ورید وداج در ماده‌ی ضد انعقاد EDTA و در کنار یخ نگه‌داری و فوراً به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری گردید. از نمونه‌های خون ورید مارجینال گوش اسمیر تهیه و پس از فیکساسیون به روش گیمسا رنگ آمیزی شد. اسمیرهای خون از نظر وجود پیروپلاسم تیلریا بررسی میکروسکوپی شدند. از نمونه‌های ورید وداج استخراج DNA پس از افزودن بافر لیز کننده با روش فنل کلروفرم صورت گرفت (۲۲)؛ برای این منظور پس از سانتریفوژ به پلت محلول پروتئیناز K و SDS اضافه گردید. در ادامه فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل اضافه شد و ترسیب با اتانل صورت گرفت. پس از افزودن بافر TE1% به DNA نمونه‌ها، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده دو ژن 18S rRNA و Tams روی نمونه‌ها انجام شد.

آزمون PCR: حجم نهایی هر واکنش برابر با ۵۰ میکرولیتر که متشکل از ۱/۵ میکرولیتر MgCl2 50 Mm ، ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میکرولیتر dNTPs Mix 10Mm، ۱ میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۵ میکرولیتر DNA (سیناژن ایران) الگو و ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (سیناژن ایران) و ۳۱/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از سویه واکسینال *تیلریا آنولاتا* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پرایمرهای Tams1 در جدول ۱ درج شده است. برای این منظور توالی ژن با نرم افزار آنلاین از NCBI گرفته شد و پرایمر اختصاصی بر اساس توالی ژن-های Tams1 و 18s rRNA با نرم افزار Gene Runner ویرایش ۳/۰۵ طراحی شد.

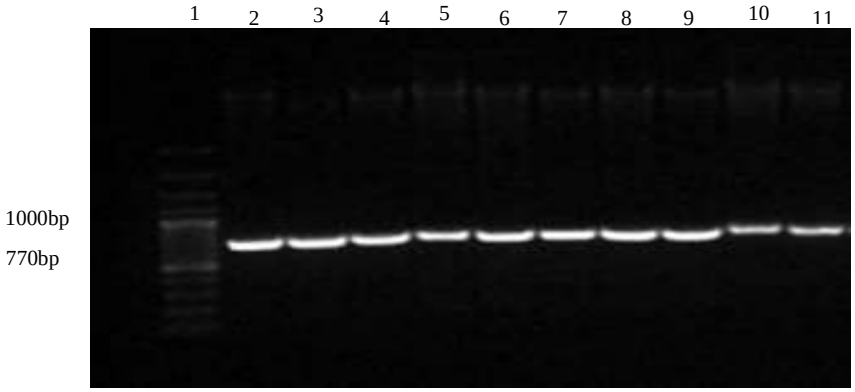
جدول ۱- پرایمرهای Tams1 و 18s rRNA برای تشخیص *تیلریا آنولاتا*

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	اندازه محصول (Bp)	شماره دسترسی (GenBank)
Tams1	F: GATGTTGTCCAGGACCACCCTCAAG R: GATAAGTTGTTACGAACATGG	۸۷۱	Z48739
18s rRNA	F: CAGATACCGTCGTAGTCC R: CCTTGTTACGACTTCTCC	۷۷۰	EU08380

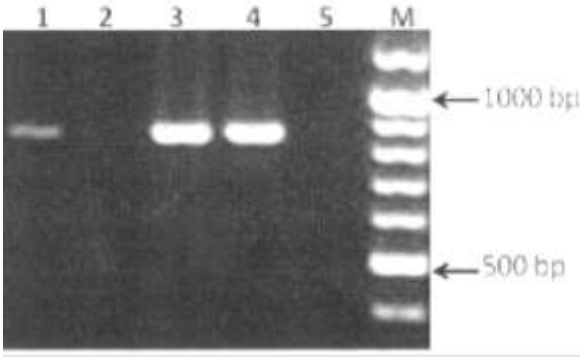
برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و متعاقب آن گسترش برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود، سپس محصول PCR با لودینگ بافر مخلوط و درون چاهک‌های ژل آگاروز ۱ درصد ریخته شد و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی گردید، در نهایت با دستگاه ژل داک عکس‌برداری انجام شد. محصول PCR یک نمونه با کیت رش (Roche, German) تخلیص و به همراه پرایمر رفت و برگشت برای تعیین توالی به شرکت سیناکلون (SinaClon Iran, Tehran) فرستاده شد و توالی‌یابی به صورت دو طرفه انجام گرفت. به منظور تعیین تشابه توالی ژنومی با توالی‌های مرجع به سایت NCBI وارد و برنامه بلاست (BLAST) اجرا گردید.

نتایج

از ۶۸ رأس گاو با علایم بالینی در ۲۸ رأس (۴۱/۱۸ درصد) آلودگی به تک یاخته تیلریا مشاهده شد. در این پژوهش در آزمون PCR برای ژن 18S rRNA اندازه قطعه ۷۷۰ جفت باز برای تمامی نمونه‌ها تکثیر شد که تایید کننده عفونت پیروپلاسمی است (شکل-۱)، همچنین نتایج آزمون PCR برای ژن Tams1 در همه موارد، قطعه ۸۷۱ جفت باز تکثیر پیدا کرده بود که تایید کننده عفونت با تیلریا آنولاست (شکل ۲). نتایج آنالیز بلاست نشان داد که بر اساس توالی ژن 18S rRNA در جدایه ایرانی در ۹۹/۱ درصد با توالی *تیلریا آنولاتا* ثبت شده در ژن بانک (KF429799)، تشابه دارد.



شکل ۱- نتایج آزمون PCR برای ژن 18s rRNA در نمونه‌های مشکوک به تیلریوز گاوی
چاهک ۱ مارکر 1Kb، چاهک ۲ کنترل مثبت سویه واکسن تیلریوز گاوی، چاهک ۳-۱۱ نمونه‌های مشکوک استان قزوین



شکل ۲- نتایج آزمون PCR برای ژنTams1 در نمونه‌های مشکوک به تیلریوز گاوی
چاهک ۱ نمونه مشکوک استان قزوین، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ کنترل مثبت سویه واکسن تیلریوز گاوی، چاهک ۴ نمونه مشکوک استان قزوین، چاهک ۵ خالی، چاهک ۶ مارکر 1Kb.

بحث

بیماری تیلریوز توسط تک‌یاخته داخل سلولی تیلریا ایجاد می‌شود که عمدتا نشخوارکنندگان را درگیر می‌کند. این تک‌یاخته دارای چندین گونه است. یکی از مهم‌ترین گونه‌ها در گاو *تیلریا آنولاتا*ست. تیلریوز نه تنها موجب کاهش تولید شیر، گوشت و مرگ و میر می‌شود (۲) بلکه مخارج اضافی مبارزه با کنه را به صنعت دامداری وارد می‌کند. در ایران نیز بیماری اهمیت فوق العاده‌ای دارد (۹) و به صورت اندمیک نه تنها در گاو بلکه در گوسفند نیز گزارش شده است (۲۸). در بررسی Ranjbar-Bahadori و همکاران از ۱۰۰ رأس گاو مشکوک به تیلریوز،۹۰ رأس آلوده به تیلریوز تشخیص داده شد که نشان‌دهنده آلودگی بالای به *تیلریا آنولاتا* بود (۱۸). در بررسی Jampour و همکاران در شهرستان گرمسار از ۲۱۱ رأس گاو مشکوک، ۱۱۹ رأس ابتلا به تیلریا را نشان دادند که تأیید کننده بررسی قبلی بود (۱۳). آزمون‌های متعددی برای تشخیص تیلریوز وجود دارد که هر کدام دارای معایب و مزایایی هستند. بسیاری از مطالعات صورت گرفته در زمینه تشخیص تیلریا بر اساس آزمایش میکروسکوپی و مشاهده اشکال پیروپلاسمی در گسترش‌های خونی انجام شده‌اند. از مزایای این روش می‌توان آسان، سریع و کم هزینه بودن و عدم نیاز به امکانات خاص نام برد، اما این آزمون حساسیت و ویژگی کمی در مقایسه با آزمون‌های دیگر (آزمون مولکولی) دارد، همچنین تشخیص صحیح موارد ابتلا به تیلریوز نیاز به تجربه بالایی دارد، البته روش‌های دیگری برای تشخیص موارد تیلریوز وجود دارد که می‌توان به روش‌های سرولوژیک ثبوت کمپلمان (CFT)ایمنوفلورسانت غیرمستقیم (IFAT) و الیزا (ELISA) و روش‌های مولکولی RLB، Real-time PCR ، PCR-RFLP (۱و ۵ و ۶ و ۲۰ و ۲۶) و روش LAMP (۲۱) اشاره کرد. Morshedi و همکاران در آزمون الایزا بررسی کردند که از مجموع ۵۶ گاو با علایم بالینی در ۷۵ درصد موارد آلودگی با *تیلریا آنولاتا* گزارش شد (۱۶). Heidarpour و همکاران میزان آلودگی به تیلریا را با آزمون RFLP-PCR ۵۶ درصد گزارش کردند (۱۱).

در این مطالعه از روش آزمایش مستقیم و مولکولی برای تشخیص استفاده گردید. نتایج نشان داد میزان آلودگی با *تیلریا آنولاتا* در آزمایش مستقیم، ۴۱/۱۸ درصد از موارد مشکوک به تیلریوز بود، همچنین در تمامی موارد مثبت آزمایش میکروسکوپی، آزمون PCR نیز مثبت شد که تایید کننده عفونت با این تک‌یاخته است. Razmi و Khodaverdi در سال ۲۰۰۸ میزان آلودگی به *تیلریا آنولاتا* را در۳۵ گاو دارای با علایم بالینی شهرستان مشهد به دو روش میکروسکوپی و PCR بررسی کردند. از مجموع موارد بررسی شده، ۱۰ (۲۸/۵ درصد) و ۱۸ مورد (۵۱/۴ درصد) به ترتیب با روش میکروسکوپی و PCR مثبت گزارش شدند (۱۹). Heidarpour و همکاران نیز ارزیابی در پنج ناحیه نیمه شرقی ایران (زابل، لار، فردوس، سمنان و گرگان) به عمل آوردند که نتیجه مشابهی به دست آمد (۱۱) که نشان دهنده اختصاصیت بیشتر PCR است. در

مجموع آزمون‌های مولکولی مناسب‌ترین روش برای تشخیص و تفریق گونه‌های تیلریا است. این آزمون دارای حساسیت و ویژگی بالایی است و مقادیر بسیار کم عفونت در نمونه قابل تشخیص است، علاوه بر این، روش مولکولی می‌تواند موارد حامل را نیز شناسایی کند که در روش‌های آزمایش مستقیم امکان‌پذیر نیست (۲۵). در اکثر مطالعات انجام شده، به منظور تشخیص تیلریا با آزمون PCR در میزبانان مختلف، از ژن 18S rRNA استفاده شده است، اما ژنTams نیز در برخی مطالعات به منظور تفریق گونه های *تیلریا آنولاتا* از سایر گونه‌ها استفاده شده است (۷ و ۱۵). در این بررسی در تمامی موارد 18S rRNA مثبت، نتیجه آزمون ژن Tams مثبت شد که تأیید کننده عفونت با *تیلریا آنولاتا* است. در مطالعه حاضر گونه *تیلریا آنولاتا* با استفاده از ژن‌های 18S rRNA و Tams1 تشخیص داده شد، لذا می‌توان با استفاده از این ژن‌ها و با طراحی پرایمر اختصاصی‌تر، با انجام Multiplex PCR در حداقل زمان ممکن با هزینه کمتر به صورت اختصاصی برای تمایز گونه های تیلریا به‌ویژه در مناطق با شیوع بالا استفاده کرد. از سوی دیگر با توجه به موارد بالای آلودگی با *تیلریا آنولاتا* در ایران و در نظر گرفتن بررسی‌های محدود به برخی از استان‌ها با آزمون‌های مختلف و معطوف شدن مطالعات روی برخی میزبان‌ها و نیز مطالعات محدودی که در انسان صورت گرفته است، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر در این زمینه صورت گیرد تا با داشتن اطلاعات اپیدمیولوژیک دقیق‌تر تدابیر مناسب‌تری برای کنترل و پیش‌گیری از این بیماری اتخاذ شود.

منابع

1- Al-Hosary, A.A; Ahmed, J; Nordengrahn, A; Merza, M; Assessment of the first commercial ELISA Kit for the diagnosis of Theileria annulata. J parasitol res.; 2015; 787812.

2- Anwar, M; Geographical distribution of blood protozoan parasites of ruminant in Iran. Bull Off Int Epiz.; 1974; 81(9-10):793-798

3- Azizi, H; Shiran, B; Farzaneh, Dehkordi, A; Salehi, F; Taghadosi, C; Detection of Theileria annulata by PCR and its comparison with smear comparison with smear method in native carrier cows. Vet Parasitol.; 2008; 99:249-259

4- Bazargani, T; Rehbari, S; Bagheri, M; Seasonal incidence of theileriosis in different breeds of cattle around Tehran and evaluation of therapeutic value of parvaquone against the disease. J Faculty Vet Med.; 1988; 42(2):18-23

5- Bilgiç, HB; Karagenç, T; Simuunza, M; Shiels, B; Tait, A; Eren, H; et al; Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of Theileria annulata, Babesia bovis and Anaplasma marginale in cattle. Exp Parasitol.; 2013; 133(2):222-229

6- Dandasena, D; Bhandari, V; Sreenivasamurthy, G; Murthy, S; Roy, S; Bhanot, V;et al; A Real-Time PCR based assay for determining parasite to host ratio and parasitaemia in the clinical samples of Bovine Theileriosis. Sci rep.; 2018; 8(1):1-7

7- Esmaelizad, M; Niaraki, S.J; Fesharaki, R.H; Molecular and phylogenetic analysis of the partial tams1 gene sequence of a vaccine strain of Theileria annulata. Braz Arch Biol Technol.; 2011; 54(6):1109-1116

8- Ghadrdan, M.A; Raazi, J.M; Kavand, M; A Survey on serum gamma glutamyl transferase, aspartate transaminase, alkaline phosphatase and bilirubin changes in Theileriotic cattle (Mediterranean coast fever). J Vet Res.; 2006; 61:23-28

9- Hajihassani, A; Maroufi, S; Fakhar, M; Alizadeh, H; Shirzad, H; Piri, F; Epidemiological Survey on Theilerosis in Kurdistan Province. The First National Congress of Veterinary Laboratory Sciences; Tehran, Iran. 2009

10- Hashemi Fesharki, R; Borine the ileriosis in Iran; Razi Institute Publications; 1th.Ed, 1986. (In persian)

11- Heidarpour Bami, M; Khazraiinia, P; Haddadzadeh, H; Kazemi, B; Identification of Theileria species in sheep in the eastern half of Iran using nested PCR-RFLP and microscopic techniques. Iran J Vet Res.; 2010; 11(3):262-266

12- Hoghooghi-Rad, N; Ghaemi, P; Shayan, P; Eckert, B; Sadr-Shirazi, N; Detection of native carrier cattle infected with Theileria annulata by semi-nested PCR and smear method in Golestan Province of Iran. World Appl Sci J.; 2011; 12(3):317-323

13- Jampour, M; Tehrani Sharif, M; Alavi, S; Abil, M; Determination of the prevalence rate of cutaneous theileriosis in infected cattle with theileriosis in Garmsar, Iran. The 15th Iranian Veterinary Congress; Tehran, Iran. 2008.

14- Khodabandeh, S; Razmi, G; Molecular detection of Theileria species and its vectors in cattles in Yazd area by Semi-nested PCR method. J Vet Res.; 2015;70(3):249-253
15- Kirvar, E; Ilhan, T; Katzer, F; Hooshmand-Rad, P; Zweygarth, E; Gerstenberg, C; et al; Detection of Theileria annulata in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. Parasitol.; 2000; 120(3):245-254
16- Morshedi, A; Hor,Y; Tavasouli, M; Dalir, N.B; A seroprevalence survey of Theileria infection by ELISA, compare with blood-smear observation in cattle. J faculty Vet Med, University of Tehran; 2003; 58:319-322
17- Radostits, O.M; Gay, C.C; Hinchcliff, K.W; Constable, P.D; Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats; Elsevier Health Sciences, 2007: 2065
18- Ranjbar-Bahadori, S; Dehghani, S; Lotfollahzadeh, S; Champour, M; Yordkhani, S; Alavi, M; Study on the relationship between clinical signs and parasitemia in theileriosis. The 15th Iranian Veterinary Congress; Tehran, Iran. 2007
19- Razmi, G; Khodaverdi, M; Diagnosis of Theileria annulata in cattle with subclinical or clinical symptoms by polymerase chain reaction (PCR). 15th Iranian Veterinary Congress; Tehran, Iran. 2008
20- Salih, D; Hassan, S; El Hussein, A; Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of Theileria annulata in cattle in northern Sudan. Prevent vet med.; 2007; 81(4):323-326
21- Salih, D; Liu, Z; Bakheit, M; Ali, A; El Hussein, A; Unger, H; et al; Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. Transbound emerg dis.; 2008; 55(5-6):238-243
22- Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T; Molecular cloning: a laboratory manual: Cold spring harbor laboratory press; 2001; 49:895-909.
23- Saulsby, E; Helminths, Arthrods and Protozoa of Domesticated Animals; Lea & Febiger, 1982
24- Selim, A.M; Das, M; Senapati, S.K; Jena, G.R; Mishra, C; Mohanty, B; et al; Molecular epidemiology, risk factors and hematological evaluation of asymptomatic Theileria annulata infected cattle in Odisha, India. IJVR., 2020; 21(4):250-256
25- Shayan, P; Rahbari, S; Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. on stained blood smear using PCR. Parasitol Res.; 2005; 97(4):281-286.
26- Sohrabi, S; Yakhchali, M; Ghashghaei, O; PCR-RELP for detecting of Theileria annulata infection in cattle and Hyalomma species in Kermanshah Province, Iran. Arch Razi Inst.; 2015; 70(1):7-12
27- Taylor, M.A; Coop, R.L; Wall, R; Veterinary Parasitology: Wiley Blackwell; 4th Edition; 2016
28- Zaeemi, M; Haddadzadeh, H; Khazraiinia, P; Kazemi, B; Bandehpour, M; Identification of different Theileria species (Theileria lestoquardi, Theileria ovis, and Theileria annulata) in naturally infected sheep using nested PCR–RFLP. Parasitol Res.; 2011; 108(4):837-843.

Vol.15/No.2
Fall-Winter 2021/2022

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2022; 15(2): 107-112.

Diagnosis of *theileria annulata* from suspected bovine with theileriosis in Qazvin province using microscopic examination and PCR

Mona Hasanzade[1*]; Lida Abdolmohammadi Khiav[2]

1. MSc of Parasitology Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Production and Research, Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran- Iran.
2. Ph.D. of Bacteriology Department of Anaerobic Bacterial Vaccine Production and Research, Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran- Iran.

Received: 13 September 2020 ***Accepted:*** 6 June 2021

Summary

Bovine theileriosis is one of the most important parasitic diseases in Iran which causes severe economic losses through decreasing weight, milk production and increased mortality. The causative agent, *Theileria annulata*, is transferred by the ticks of genus Hyalomma. Diagnosis of theileriosis is based on clinical signs, microscopic examination. Nowadays, molecular biology methods like PCR are used for detection. Given the importance of bovine theileriosis, the aim of this study was diagnosis of T. annulata from suspected bovine with theileriosis in Qazvin province using microscopic examination and PCR. Out of 68 dairy cattle with clinical symptoms were taken from blood samples. Then the blood smear was prepared and stained with Giemsa dye. Positive samples were incorporated for molecular studies. DNA of blood was extracted using phenol/chloroform/isoamyl alcohol and performed PCR using specific primers of Tams1 and 18S rRNA genes. Then, the PCR product of one sample was sequenced. Based on the obtained results, out of 68 in 28 (41.18%) blood samples was observed *Theileria annulata* by light microscopy, whereas all of the samples were positive by PCR. BLAST analyses based on the 18S rRNA gene sequence of the Iranian isolate determined the 99.1% identity. Based on the obtained results, T. annulata had a high frequency in cattle of Qazvin province. It is suggested that further studies be conducted in this field in order to obtain more accurate estimates of disease in Iran.

Keywords: Molecular detection, *Theileria annulata*, Qazvin, Cattle

***Corresponding Author:** muna1361@gmail.com