

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

صغری خدابنده<sup>۱</sup>، غلامرضا رزمی<sup>۲\*</sup>

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 تیلریا در گاو و کنه‌های ناقل صورت گرفته که در مقایسه با روش‌های مولکولی از حساسیت و ویژگی کمی برخوردارند. **هدف:** در این مطالعه سعی شد گونه‌های تیلریا و ناقلین آن در گاوهای شهرستان یزد با روش Semi-nested PCR مورد شناسایی قرار گیرند. **مواد و روش کار:** طی ماه‌های خرداد تا شهریور سال ۱۳۹۱، تعداد ۱۰۰ نمونه خون EDTA به همراه گسترش‌های نازک خون از گاوهای شیری نژاد هلشتاین مشکوک به تیلریوز بدون سابقه واکسیناسیون بر علیه بیماری تهیه گردید. همزمان با بازرسی بدن گاوها تعداد ۲۴۹ عدد کنه جمع آوری شدند گسترش تهیه شده با گیمسا رنگ آمیزی شدند و 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 با استفاده 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 ژن rRNA ۱۸S، مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت تشخیص تیلریا لستو کاردی و تفریق آن از تیلریا آئولاتا در 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 آئوتولیکوم آئوتولیکوم 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 آئولاتا بودند. هیچ یک از نمونه‌ها آلوده به تیلریا اورینتالیس 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 آئولاتا و کنه هیالوما آئوتولیکوم آئوتولیکوم عامل و ناقل مهم تیلریوز گرمسیری در شهرستان یزد می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: تیلریا، گاو، Semi-nested PCR

### مقدمه

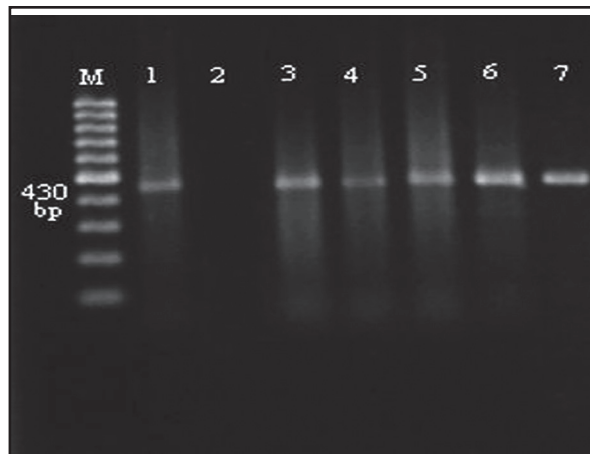
اکسکواتوم، هیالوما آئوتولیکوم، هیالوما درومداری و هیالوما دتریتوم انتقال می‌یابند (۴). تیلریا اورینتالیس گونه دیگری است که در گاوهای استان‌های مازندران و استان گلستان نیز گزارش شده است (۲، ۴). تشخیص گونه‌های تیلریا معمولاً بر پایه تشخیص مورفولوژی انگل در گسترش‌های رنگ آمیزی شده خون می‌باشد (۱۴). گونه‌های مختلف تیلریا از لحاظ مورفولوژی شبیه بوده و تشخیص تفریقی این گونه‌ها بخصوص در دام‌های حامل با پارازیتمی پایین آسان نمی‌باشد. بهمین دلیل امروزه از روش‌های مولکولی 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 هر ساله با شیوع نسبتاً بالا مشاهده می‌شود ولی تاکنون مطالعه در باره تیلریوز گاوی در این شهرستان انجام نشده است. در این مطالعه تلاش شد تا گونه‌های تیلریا و ناقلین آن در گاوهای این شهرستان با روش Semi-nested PCR مورد شناسایی قرار گیرند.

تیلریوز در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی در مناطق گرمسیری و تحت گرمسیری جهان بروز می‌کند و باعث خسارات اقتصادی فراوانی می‌شوند. تیلریا آئولاتا و تیلریا پاروا مهمترین گونه‌های مسئول تلفات و کاهش تولید در گاوهای شیری می‌باشند. تیلریا آئولاتا گسترده‌ترین جغرافیایی بالایی دارد و در اروپای جنوبی، ساحل مدیترانه، خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیا مشاهده می‌شود. تیلریا پاروا در افریقای شرقی و مرکزی پراکنده است. تیلریا اورینتالیس گونه دیگری است که در سراسر جهان پراکنده است و نسبت به تیلریا آئولاتا و تیلریا پاروا غیر بیماریزا بوده، اگرچه مواردی از بیماری ناشی از این گونه در کشور ژاپن با تب، کم خونی و بی‌اشتهایی همراه است (۹، ۱۴). تیلریا آئولاتا عامل تیلریوز گاوهای مناطق مختلف ایران را آلوده نموده و با علائم تب، بزرگی غدد لنفاوی، کم خونی پیشرونده، زردی، بیقراری، بی‌اشتهایی، خشن شدن پوشش مویی، تورم ریه، تنگی نفس، اختلال در هضم و زخم‌های شیردانی دیده می‌شوند بیماری در ایران توسط کنه‌های هیالوما آئوتولیکوم آئوتولیکوم، هیالوما آئوتولیکوم

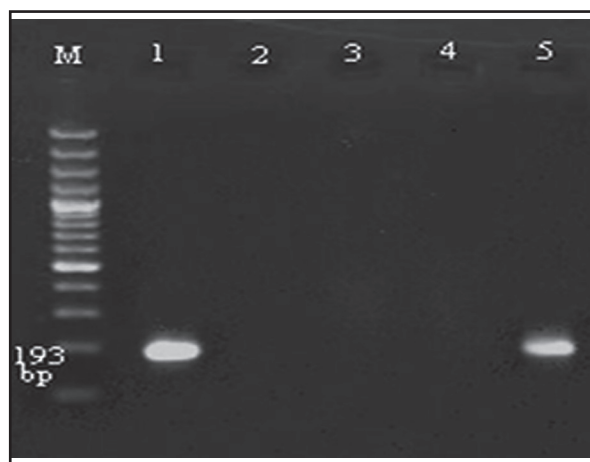


جدول ۱. مقایسه فراوانی آلودگی تیلریا آتولاتا با دوروش میکروسکوپی و ملکولی در گاوهای شهرستان یزد.

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



تصویر ۱. آنالیز تکثیر DNA استخراج شده در مرحله اول Semi nested-PCR: M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، باز، چاهک ۱: کنترل مثبت تیلریا، چاهک ۲: منفی تیلریا، چاهک ۳-۷: نمونه‌هایی که تیلریا مثبت شده‌اند.



تصویر ۲. تکثیر DNA استخراج شده در مرحله دوم Semi nested-PCR: M: مارکر DNA (۱۰۰bp)، باز، چاهک ۱: کنترل مثبت تیلریا آتولاتا، چاهک ۲: کنترل منفی تیلریا آتولاتا، چاهک ۳-۵: نمونه‌های منفی خون و نمونه ۵ نمونه مثبت.

## نتایج

از مجموع ۱۰۰ گاو خونگیری شده، در (۴/۴) گسترش‌های خونی آلودگی به تک یاخته تیلریا آتولاتا مشاهده شد، در حالیکه با روش semi nested PCR در (۱۱/۱۱) ۱۱ نمونه‌های خون، آلودگی به تیلریا آتولاتا تعیین گردید (تصاویر ۱، ۲). آزمون آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج بدست آمده توسط دو روش را تأیید نمود. (جدول ۱) ( $p > 0.05$ ) در هیچ یک از نمونه‌ها آلودگی به تیلریا آتولاتا با روش میکروسکوپی مشاهده نشد.

## مواد و روش کار

طی ماه‌های خرداد تا شهریور سال ۱۳۹۱، پس از هماهنگی با اداره دامپزشکی شهرستان یزد، خونگیری از تعداد ۱۰۰ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین به ظاهر سالم از دامداری‌های با سابقه تیلریوز انجام گرفت. پس از ثبت مشخصات گاوها از گاوهای مشکوک و غیر واکسینه بر علیه تیلریا پس از و ضد عفونی کردن محل تزریق، از ورید و داج به میزان ۳mL خون گرفته و به لوله حاوی EDTA انتقال داده شد. همزمان از ورید مارژینال گوش نیز گسترش نازک تهیه گردید. در مرحله آخر بدن گاوها با زرسی و کنه‌ها از روی دام جمع آوری شد. نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه دانشکده انتقال داده شد و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - تا زمان انجام آزمایش نگه داری گردید. در آزمایشگاه گسترش‌های 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 بررسی قرار گرفتند. جنس و گونه‌های کنه‌های جمع آوری شده بر اساس بر اساس کلیدهای تشخیص تعیین شدند (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 و قیچی حشره شناسی غدد بزاقی خوشه انگوری هر دسته کنه جدا و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۰µL سرم فیزیولوژی منتقل شدند میکروتیوب‌ها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA نمونه‌های خون و غدد بزاقی با استفاده از کیت تجاری (MBST، تهران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. نمونه‌های DNA استخراج شده با روش semi nested PCR با روش Shayan&Rahbari صورت گرفت (۱۳، ۲۰). در مرحله اول روش semi nested PCR با استفاده از این پرایمرها یونیورسال نمونه از لحاظ آلودگی تیلریا و با بانداز هم تفکیک می‌شوند. محصول PCR مربوط به بانداز بر روی ژل آگاروز ۱/۷٪ باندی با سایز ۳۸۹-۴۰۲ bp و در محصول PCR مربوط به تیلریا باندی با سایز ۴۳۰-۴۲۶ bp تشکیل می‌دهند. در مرحله دوم محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به تیلریا آتولاتا سایز باند ۱۹۳ bp و مربوط به تیلریا آوریبتالیس ۲۳۵ bp خواهد بود. در هر PCR حداقل یک تیوب واجد خون غیر آلوده بعنوان کنترل منفی و خون آلوده بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید. با توجه به تشابه ملکولی تیلریا آتولاتا با تیلریا لستو کاردی برای تفریق این دو تک یاخته، محصول PCR در مرحله اول توسط آنزیم MspI طی واکنش RFLP مورد هضم آنزیمی با متد Spitalska و همکاران در سال ۲۰۰۴ قرار گرفت (۱۵). این آنزیم محصول DNA مربوط به تیلریا آتولاتا را برش نمی‌دهد ولی DNA مربوط به تیلریا لستو کاردی را برش می‌دهد. نتایج بدست آمده در دو روش میکروسکوپی و ملکولی با آزمون مک نمار (MacNemar's Test) - مورد آزمون آماری قرار گرفت.



هیالوما آتاتولیکوم آتاتولیکوم تشخیص داده شدند و همچنین آزمایش PCR آلودگی غدد بزاقی کنه‌ها را به تیلبریا آتاتولیکوم نمود. مطالعات انجام یافته در ایران نیز براهمیت کنه هیالوما آتاتولیکوم در انتقال تیلبریا آتاتولیکوم دارد (۴). Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعداد ۶۸۰ کنه از ۱۰۲ گاوهای مشکوک به تیلبریا در شهرستان مشهد جمع آوری کردند که ۹۲٪ کنه‌ها هیالوما آتاتولیکوم اکسکواتوم تشخیص داده شدند و همچنین این کنه بعنوان ناقل اصلی تیلبریا آتاتولیکوم رنگ آمیزی غددبزاقی و مشاهده آلودگی تعیین گردید (۱۰). Tavassoli و همکاران در سال ۲۰۱۱ در غرب و شمال غرب ایران از ۲۳۷ گاو آلوده به تیلبریا آتاتولیکوم ۴۰۲ کنه جدا کردند که پس از آزمایش با روش PCR، ۳۹/۹٪ از کنه‌های هیالوما آتاتولیکوم آتاتولیکوم، ۱۸/۲٪ از کنه‌های هیالوما آتاتولیکوم اکسکواتوم و ۳/۵٪ از کنه‌های هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم آلوده به انگل تیلبریا آتاتولیکوم بودند. این نتیجه نشان داد که هیالوما آتاتولیکوم نقش اصلی را در انتقال تیلبریا آتاتولیکوم از ایران بازی می‌کند (۱۶). کنه هیالوما آتاتولیکوم بعنوان ناقل مشترک تیلبریا آتاتولیکوم نیز وجود دارد (۶). از آنجاییکه به علت آلودگی گاوها به تیلبریا لستو لستو کاردی نیز وجود دارد (۶). از آنجاییکه به علت شباهت بسیار زیاد سکانس نوکلئوتیدی این دو گونه، امکان تفریق دو گونه با استفاده از پرایمرهای استفاده شده در روش PCR حاضر وجود ندارد. به همین دلیل نمونه‌های مثبت، با روش RLFP-PCR مورد آنالیز قرار گرفتند (۱۵). که نتایج بدست آمده موید عدم آلودگی نمونه DNA استخراج شده از غدد بزاقی کنه‌ها به تیلبریا لستو کاردی بودند. با توجه به نتایج این مطالعه اهمیت گونه تیلبریا آتاتولیکوم و کنه هیالوما آتاتولیکوم بعنوان عامل و ناقل بیماری در گاوهای شهرستان یزد مورد تأیید قرار می‌گیرد.

### تشکر و قدردانی

از آقای عشرتی کارشناس بخش انگل شناسی بخاطر همکاری در انجام آزمایش PCR تشکر می‌گردد. از شبکه دامپزشکی شهرستان یزد که زمینه نمونه برداری از گاوهای شیری را فراهم آوردند، قدردانی می‌گردد. این پایان نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی انجام گرفت، از معاونت و همکاران 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. *Bio-technology*. 7: 574-577.
2. Ghaemi, P., Hoghooghi-Rad, N., Shayan, P., Eckert, B. (2011) Detection of *Theileria orientalis* in

جمع آوری شده (۱۹۴ کنه نر و ۸۵ کنه ماده)، همگی هیالوما آتاتولیکوم آتاتولیکوم تشخیص داده شدند. نتایج ملکولی بر روی ۵۰ مجموعه غدد بزاقی کنه، نشاندهنده آلودگی سه مجموعه از آنها به تیلبریا آتاتولیکوم بود. آزمایش تکمیلی PCR-RLFP نیز عدم آلودگی نمونه‌های مثبت غددبزاقی کنه‌ها را به تیلبریا لستو کاردی را تأیید نمود.

### بحث

بر اساس مطالعات انگل شناسی و مشاهدات بالینی دو گونه تیلبریا آتاتولیکوم تیلبریا اورینتالیس در ایجاد آلودگی تیلبریایی در گاوهای ایران نقش دارند (۴). اکثر مطالعات صورت گرفته در زمینه شناسایی گونه‌های تیلبریا گاو در ایران بر اساس مشخصات مرفولوژیکی در بررسی میکروسکوپی بوده که از حساسیت و ویژگی کمی در برابر روش مولکولی برخوردار است. در این بررسی از دو روش میکروسکوپی و ملکولی جهت تشخیص گونه‌های تیلبریا گاوی استفاده شد و آلودگی تیلبریا آتاتولیکوم با روش میکروسکوپی در ۴٪ گاوهای شهرستان تعیین گردید. میزان آلودگی بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با نتایج بدست آمده توسط Morchedi و همکاران در سال ۱۳۸۲ با گزارش آلودگی تیلبریا آتاتولیکوم به میزان ۱۵٪ در گاوهای شهرستان ارومیه (۷) و مطالعه Razmi و همکاران در سال ۲۰۰۹ با گزارش آلودگی به انگل تیلبریا آتاتولیکوم به میزان ۲۰٪ در گاوهای شهرستان مشهد (۱۱) کمتر بوده در حالیکه با نتایج Shahgholian و همکاران در سال ۲۰۰۳ در شهرکرد با تعیین ۴/۹٪ آلودگی تیلبریایی در گاوها (۱۲) و مطالعه Mozafari و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تعیین فراوانی تیلبریوز گاوی در ۵/۶٪ گاوها شهرستان زاهدان همخوانی دارد (۸). در این مطالعه آلودگی گاوها به تیلبریا آتاتولیکوم ۱۱٪ نمونه‌ها با روش PCR تعیین شدند. آنالیز آماری حساسیت بالاتر این روش را در مقایسه با روش میکروسکوپی نشان داد. تاکنون مطالعات اندکی در باره آلودگی تیلبریا در گاوهای ایران با روش ملکولی صورت گرفته است. Azizi و همکاران در سال ۲۰۰۷، ۱۴۰ رأس گاو بالای ۱ سال را در شهرکرد از نظر آلودگی به تیلبریا آتاتولیکوم مورد بررسی قرار دادند. میزان آلودگی به تیلبریا آتاتولیکوم به میزان ۴۰٪ تعیین نمودند (۱). Hoghooghi-Rad و همکاران در سال ۲۰۱۱ با روش ملکولی مشابه این مطالعه در ۷/۵٪ گاوهای استان گلستان آلودگی به تیلبریا آتاتولیکوم مشخص نمودند (۵). در مطالعه حاضر آلودگی به تیلبریا اورینتالیس در گاوهای استان یزد مشاهده نگردید. بنظر می‌رسد این گونه فقط در استان‌های حاشیه دریای مازندران دیده می‌شود (۴) در تنها مطالعه ملکولی انجام شده توسط Ghaemi و همکاران در طی سال‌های ۲۰۱۱ از ۱۶۰ نمونه خونی جمع آوری شده از گاوهای به ظاهر سالم در استان گلستان در شمال ایران و با استفاده از روش Semi-nested-PCR در ۵/۶۲٪ گاوها آلودگی به انگل تیلبریا اورینتالیس و ۷/۵٪ گاوها آلودگی به انگل تعیین نمودند (۲). در بررسی حاضر تمام کنه‌های جمع آوری شده کنه



- 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 (1<sup>st</sup> 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 studies of *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 (10<sup>th</sup> 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 (7<sup>th</sup> 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., Esmailnejad, 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., Estradapana, A. (2004) Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region (1<sup>st</sup> ed.) University of Zaragoza. Zaragoza, Spain.



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

Khodabandeh, S.<sup>1</sup>, Razmi, Gh.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran

<sup>2</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran

(Received 9 December 2014, Accepted 18 February 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, using 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 theileriosis 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 Semಿನested-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 Semಿನested- 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](mailto:razmi@um.ac.ir), Tel: 051-38763852, Fax: 051-38763851

J. Vet. Res. 70, 3:249-253, 2015