

عزل ٣ أجناس من الأوليات تصيب دم حيوانات المزرعة بالمنطقة الشرقية من المملكة العربية السعودية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR-RALF

سعاد محمد الصقعي ، سارة عبدالله الجبران
جامعة الدمام – كلية العلوم – قسم الاحياء شعبة علم الحيوان

تاريخ القبول: ٢٠١٠/١٢/٢٠

تاريخ التسليم: ٢٠١٠/٩/٣٠

الملخص

الإصابة بالطفيليات الخارجية من أهم عوامل انتشار الأمراض ومسبباتها في حيوانات المزرعة. وتكمن أهمية مكافحتها بمعرفتها وتحديد أجناسها بدقة. إشملت الدراسة على فحص العينات الدموية للكشف عن الطفيليات الأولية الدموية المنقولة بواسطة القراد ، حيث سجلت الدراسة ٣ أجناس هي: *Babesia ovis* , *Babesia motasi*, *Theileria annulata*, *Theileria lestoquardi*, *Trypanosoma vivax* و *Trypanosoma congolense*. وأوضحت الدراسة دقة وحساسية اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في الكشف عن الأوليات الدموية وتحديد أنواعها. كما أظهرت الدراسة ضرورة استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لوضع البصمة الوراثية لجميع الأنواع التي تصيب الحيوانات المحلية لأهم الأجناس، وأنواع الطفيليات الدموية الموجودة بالمملكة العربية السعودية. وتتم استعمال هذه التقنية على الطفيليات الدموية لصعوبة تحديد أنواعها بشكل سليم بالطرق التقليدية وتعتبر الدراسة الأولى في هذا المجال.

كلمات دليلة: *Babesia*, *Theileria*, *Trypanosoma*، المملكة العربية السعودية، حيوانات المزرعة. PCR-RALF.

المقدمة

تعتبر إصابة حيوانات المزرعة بالطفيليات الخارجية من أهم عوامل انتشار الأمراض ومسبباتها . ولا تقتصر مكافحتها على جمعها أو معرفة أماكن تواجدها، بل تكمن الأهمية في معرفة وتحديد أجناسها بدقة لمعرفة كيفية القضاء عليها أثناء وضع برنامج لمكافحتها. من الدراسات في المملكة العربية السعودية على الطفيليات الدموية ما قام به Hussein et al. (1991) أثناء دراسة طفيليات الدم في الحيوانات المستأنسة المحلية، والتي تصاب بطفيليات الدم التي ينقلها القراد الجامد *Hyalomma anatolicum* المتواجد في المملكة. وفي شمال سيناء درس العالمان Mazyad & Khalaf (2002) الإصابة بـ *Babesia*, *Theileria* التي تصيب الحيوانات المنبوحة في مسلخى العريش والحسنة، ووجد أن الأغنام والماعز احتوت على أجناس القراد التالية *Hyalomma* و *Rhipicephalus* و *Haemaphysalis*. أما الدراسات حول التايثيريا والباييزيا (*Babesia*, *Theileria*) التي تمت في العالم ، فقد تمكن العلماء في إيران وجنوب إيطاليا (Savini et al., 1999; Hashemi-Fesharki, 1997) من دراسة القراد والأمراض المنقولة بواسطته على الأغنام

والماعز ووجدوا أن الاجناس الرئيسية للقراد في هذه الأنواع

هي *Haemaphysalis* و *Hyalomma*, *Rhipicephalus* و *Ixodes* ونادراً *Dermacentor*.

ومن أولى الدراسات على التقنية الجزيئية قام Ceci et al., (1999) بتعريف *Theileria buffeli /orientalis* و *Babesia bigemina* التي تصيب الماشية. كما قام كل من Nagore et al. (2004), Kirvar et al., (2000), Schnittger et al.,(2000) بتعريف طفيل *Theileria* الذي يصيب الأغنام بمرض *Theileria lestoquardi* عن طريق تحليل rRNA. أما Schnittger et al. (2004) فقد عرف الفروقات الجينية بين طفيلي *Theileria* و *Babesia* والمتطفلة على المجترات الصغيرة، حيث تم تمييز أربع مناطق في السلاسل الجينية ساهمت في تحديد النوع. وفي شرق تركيا طور العالم Aktas et al., (2005) طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن طفيل *Babesia ovis* حيث قام بعزل (ssu rRNA) من الطفيل ، وللتعريف تم استخدام primer مستخلص من دم أغنام وماعز مصاب بطفيل *B. ovis*. وتم أخذ نسبة مخففة من الكريات الحمراء المحتوية على *B. ovis* بنسبة ١٪ عن طريق سلسلة تخفيف من دم

ومن أشهر الأوليات التي تصيب الحيوانات *Trypanosoma evansi* وبالذات في الجمال . وفي منطقة القصيم والاحساء في وسط المملكة العربية السعودية قام Omer et al. (2006); Al-Mohammed, (2006) بتعريف *Trypanosoma evansi* التي تصيب الجمال العربية (*Camelus dromedarius*) بواسطة اختبار haemagglutination السلبي و Ag-ELISA. ومن أهم الدراسات القائمة عليها ما قام به وعزقه Zhang and Baltz (1994); Li et al., (2005); Singh, et al. (2004); Njiru et al. (2007) على *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* بواسطة تحليل DNA. كما تمت المقارنة بين الفحوصات المختلفة كالشرائح المصبوغة وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل، ووجد أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل كانت أكثر حساسية في اكتشاف *T. evansi* من الاختبارات الأخرى المستعملة. وقام Simukoko et al. (2007) بمقارنة أنواع التريبانوسوما التي تصيب حيوانات المزرعة في هضبة شرق زامبيا باستخدام تقنية PCR-RFLP كأداة تشخيصية، ووجد أن أغلب الإصابات (91,2%) كانت بالنوع *Trypanosoma*. وتهدف الدراسة الحالية إلى تصنيف الطفيليات الدموية التي تصيب الجمال والأغنام والماعز في مزارع المنطقة الشرقية في المملكة العربية السعودية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR-RALF .

المواد والطرق

أجريت هذه الدراسة لتصنيف ووصف الطفيليات الدموية التي تصيب حيوانات المزرعة بالمنطقة الشرقية بالمملكة العربية السعودية خلال عام 2007م. تم سحب عينات الدم من الحيوانات المحلية المصابة بالطفيليات الخارجية (الجمال *Camelus dromedarius*، الأغنام *Ovis aries* والماعز *Capra hircus*) من مختلف المزارع والمسالخ في المنطقة الشرقية. وقد تم الجمع من عينات عشوائية وأعمار مختلفة (حيث تراوح عمر الصغيرة من 1-12 شهرا، بينما تراوح عمر الكبيرة منها من 1-5 سنوات). وضعت العينات في أنابيب محتوية على المادة المانعة للتجلط (EDTA K3) حيث تم حفظها في حافظة مبردة. ولتحضير العينات للدراسة بالمجهر الضوئي تم تحضير شرائح دائمة مصبوغة بواسطة صبغة جيمسا Giemsa's solution وذلك لفحصها وتصويرها

أغنام سليمة، ثم نزع DNA لطفيل *B. ovis* لاختبار حساسيته في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. وكشف عن تواجد الطفيل مهما قلت نسبة تواجده في العينة. في بعض الدراسات قام Tomasson et al. (2005) Teglas et al., (2005) بجمع عينات القراد وعينات دموية من المواشي والخيول وتم التعرف عليها عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وكان الطفيل الدموي الشائع تواجده هو *Babesia spp*. في جمهورية غينيا تم الكشف عن جنس *Babesia caballi* في قراد *Amblyomma variegatum* والذي قام بجمعه من الماشية، حيث تم التمييز بين نوع الطفيل الدموي عن طريق معرفة التسلسل الجيني للحمض النووي rRNA. وعند فحصها كانت النتيجة إيجابية لطفيل *Babesia caballi* بينما كانت النتيجة إيجابية في خمس عينات فقط لطفيل *Theileria velifera*. وفي اليونان عرف Thill et al., (2005); Theodoropoulos et al., (2006); Hilpertshauer et al., (2006); Pieniazek et al., (2006); Wojcik-Fatla et al., (2006) أنواع طفيل *Babesia* وحدد إنتشارها في المجترات الصغيرة عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل. ووضع Allsopp and Allsopp (2006) دليل للسلسلة الجزيئية لإعادة تعريف بعض الأنواع لطفيل *Babesia* والتميز بينها وبين طفيل *Theileria* عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في غرب بولندا. وفي تركيا درس Altay et al. (2007) التعريف الجزيئي الوراثي لأنواع طفيل *Babesia species*, *Theileria* والتي تصيب المجترات الصغيرة. وقد حدد نفس الباحث وآخرون العوامل المساعدة لإنتشار الطفيل عن طريق هذه التقنية وكان الفرق واضح في نسبة الإصابة بين الأغنام والماعز، لكن لم يظهر أي فرق إحصائي خاص بالفئة العمرية. ووضحت التجربة أن تواجد هذا المرض في المجترات الصغيرة واكتشافه يكون أدق بتفاعل البلمرة المتسلسل أكثر من الفحص باستخدام المجهر الضوئي. وقام Quintao-Ailva et al., (2007) بالمقارنة بين تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتقنيات المجهرية للتعرف على طفيل *Babesia bigemina* و *Babesia bovis* والمنقول بواسطة إناث القراد من جنس *Boophilus*. وأظهرت دراسة تحليل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR أن نسبة الإصابة قد بلغت 77,8% *Babesia*. أما بخصوص الدراسات القائمة على التريبانوسوما، فتعتبر المتقيات من الحيوانات الأولية المتطفلة على دم الفقاريات

وتتكون الفتحات. أخذ خليط الحمض النووي الناتج وأضيف إليه صبغة بروميد الأيثيديوم Ethidium bromide ثم صب في الفتحات الخاصة به في الجل المتماص. ثم غبأ الجهاز بالمحلول المنظم TAE buffer حتى غطى الجل تماماً. وُصلت الأقطاب بالمصدر الكهربائي عند ٤٠ فولت و٨ أمبير ولمدة ٦٠ دقيقة. رُفَع الجل من الجهاز وقرأ وصُور تحت الأشعة فوق البنفسجية من نوع UV-Trans- illuminator 2000 (Bio-Rad, Italy). (Shayan & Rahbari, 2005).

النتائج والمناقشة

أظهرت الدراسة وجود إصابة بالطفيليات الدموية في الأغنام والماعز والجمال في المنطقة الشرقية (الخبر- الدمام- الجبيل- الأحساء) عند الأعمار المختلفة، بينت الدراسة تواجد الطفيليات الأولية حيث سجلت الدراسة ٣ أجناس باستخدام المسحات التقليدية المصبوغة بجيمسا وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التي أظهرت نتائج دقيقة في تحديد الأنواع وهو يتوافق مع نتائج كل من D' Oliveria et al (2005); Shayan and Rahbari, (1995). وعند دراسة دم حيوانات المزرعة بالفحص المجهرى الضوئي للمسحات المصبوغة أظهرت الدراسة جنسي *Theileria*, *Babesia* وهي تتفق مع الدراسات بمختلف المناطق Savini et al (1999) Papadopoulos (1999). تم تحليل عينات الحمض النووي DNA المستخلصه من ٢٤ عينة. عزل نوعين من جنس *Babesia* ونوعين من جنس *Theileria* ونوعين من جنس *Trypanosoma* من دم الحيوانات المفحوصة. وصنفت تبعاً لـ Levine et al, (1980)، عزل نوعين من طفيل البابيزيا *Babesia spp* وهما *B. motasi* و *B. ovis* حيث تواجد كل منهما في الجمال فقط. سجلت الدراسة عند الباند ٢٣٩ لطفيل *Babesia spp*، بينما سجلت عند الباند ١٨١ تواجد *Babesia ovis* والباند ١٧٩ لـ *Babesia motasi*. (شكل رقم ٢-١، أ- ب و جنول ٢-٣). تم عزل نوعين من *Theileria spp* وهما *Th. Annulata* و *Th. lestoquardi*، فقد تواجد النوع *Th. annulata* في كل من الأغنام والماعز والجمال، بينما تواجد النوع *Th. lestoquardi* في الأغنام والماعز فقط. وسجلت الدراسة عند الباند ٤٣٠ لطفيل *Theileria spp*، بينما سجلت عند الباند ٢٧٥ لطفيل *Th. annulata*، وعند الباند ٢٣٥ لطفيل

(Shayanand Rahbari. 2005). وتم تحليل العينات للدراسة الجزيئية بمعامل قسم التكنولوجيا الحيوية في جامعة الخليج بالبحرين باستخدام ٢١ برامير primer (جدول رقم ١) وكذا إستخلاص الحمض النووي (DNA) عن طريق استخدام محاليل مخصصة هي QIA amp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)، التي تمت بطريقة conventional PCR كالتالي :

أخذ ٢٠٠ ميكروليتر من عينة الدم وأضيف إليها ٢٠ μ من الأنزيم المحلل للبروتين Proteinase K و٢٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم lysis buffer. ووضعت الأنابيب في حضان مائي عند درجة حرارة ٥٦° لتندمج المكونات مع بعضها البعض ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي. أخذ الخليط السابق وأضيف إليه ٢٠٠ ميكروليتر من الكحول المطلق ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لاستخلاص الحمض النووي DNA وتم استخلاصه وغسله عن طريق استخدام محلول النزاع elution buffer .kit

ولمزم تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Mix مُزجت بعض المكونات بنسب معينة على حسب المادة المراد الكشف عنها، وإحتوى هذا المزيج على : ماء مقطر، DNA المراد الكشف عنه، الباندات Primers (جدول ١)، كاشف تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد الإستخدام (Qiagen, USA). ولتحديد خطوات دورة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR cycles تم في هذه الخطوة مضاعفة حمض DNA ، حيث بُرمج الجهاز بالشكل التالي : تم التحضين لمدة خمس دقائق على درجة حرارة ٩٥° لكسر الروابط الهيدروجينية في الحمض النووي (مرحلة التنكيك Denaturation). عقب التحضين ٣٥ دورة على درجة حرارة ٩٤° لتبديل طبيعة الحمض النووي، تلاها تغيير درجة حرارة إلى ٥٦° لمدة دقيقتين للتلين (تكوين الروابط) (مرحلة الالتصاق anneal)، ثم إلى ٧٢° لمدة عشر دقائق لعمل إستطالة وبناء الحمض النووي (مرحلة الامتداد extention).

ولقراءة النتائج Detection of products تم الفحص باستخدام جل الأجاروس، حيث أذيب ١.٥ جم من جل الأجاروس في ١٠٠ مل من المحلول المنظم TAE buffer عن طريق التسخين ثم صب السائل في خلية جهاز الهجرة الكهربائية الأفقي (الإلكتروفوريسس Electrophoresis) ووضعت الأمشاط الخاصة به لوقت كاف حتى يتماسك الجل

دلالة على وجود *Th. lestoquardi* والتي كانت متوافقة مع نتائج Shayan and Rahbari (2005). كما كانت الدراسة إي إيجابية للتتابع الجيني

(5' CAGGATTGCTTTTCGAACAAAG 3')

و (5' CCTTGACATAACCGGCGAGG 3') عند الباند ٢٣٩ و (5' AAGAATTTACCTCTGACAG 3') عند الباند ٣٨٩ - ٤٠٢ ، عند فحص العينات الدموية لتعري *Babesia spp.* ، و (5' TGCGCGCGGCCTTTGCGT 3') عند الباند ١٨١ دلالة على وجود *B. motasi* كما أكده Shayan and Rahbari (2005). وبينت الدراسة نتائج إيجابية للتتابع الجيني CAGTGCTCCCGCTCGTACACGGAC و GCACGCCACATAGCCGGGGAACAG عند الباند ٢٦٦ دلالة على وجود *T. vivax* ، والذي يتوافق مع نتائج Clausen et al. (1998). بينما أظهرت نتائج إيجابية عند التتابع الجيني

TCGAGCGAGAACGGGCACTTTGCGA
GTTTTCGATGAAAATTAGGGACAAACAAT
CCCGCACA عند الباند ٣٣٩ دلالة على وجود *T. congolense*. من هذه الدراسة اثبتت إمكانية استخدام هذه التقنية لدقة وحساسية اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في الكشف عن الأوليات الدموية وتحديد أنواعها.

Acknowledgements الشكر والتقدير

الشكر والتقدير لمدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية بالمملكة العربية السعودية التي قامت بتمويل المشروع البحثي رقم (أط-١٥-٣٢)

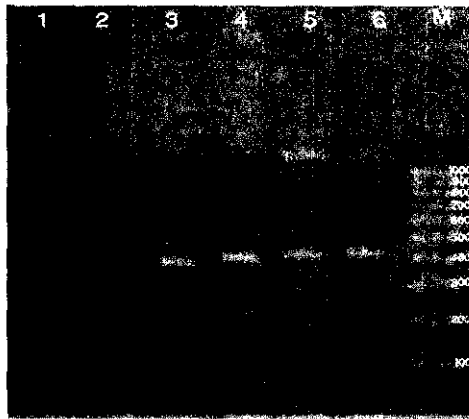
Th. lestoquardi (شكل رقم ٣، ج وجدول ٤). عزل نوعين من *Trypanosoma* وهما *T. congolense* و *T. vivax*. فقد تواجد النوع *T. congolense* على الجمال والأغنام والماعز، بينما تواجد النوع الآخر *T. vivax* على الجمال فقط. وسجلت الدراسة عند الباند ٣٣٩ الطفيل *T. congolense*، وعند الباند ٢٢٦ طفيل *T. vivax* (شكل رقم ٤، د وجدول ٥). ولوحظ تواجد عدوى مختلطة بين كل من *T. congolense* و *Babesia* في الجمال، وبين *T. congolense* و *Theileria* في الماعز. وبين *T. vivax* و *Babesia* في الجمال (جدول ٦). أظهرت الدراسة وجود فروق بين كل من الأغنام والجمال في حين وجد الباحثون (Aktas et al. (2007) في دراستهم على الأغنام والماعز أنه لا توجد هناك أي فروق معنوية في نسب الإصابة. وقد أثبتت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل حساسيتها ودقتها في إعطاء النتائج، حيث تم الكشف عن الإصابات التي لم تظهر أثناء فحص المسحات التقليدية. كما تم تحديد النوع والجنس بدقة أكبر من استعمال المسحات التقليدية، وهي تتفق مع ما قام به كل من (ktas et al. (2005، (D'Oliveira et al. (2000، (Kirvar et al., (1995، (Thill et al., (2005، (Tomasson et al. (2005، (Wojcik-Faha, et al. ، (Theodoropoulos et al., (2006، (Pieniazek et ، (Allsopp & Allsopp, (2006) ، (2006) ، (AKtas, et ، (Hilpertshauer et al. (2006) ، (2006) ، (Quintao-Ailva et al. Torina et al. (200) ، (2007) ، (2007). وأعطت الدراسة نتيجة إيجابية عند التتابع الجيني (5' CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3') والذي يظهر عند الباند ٤٢٦ - ٤٣٠ دلالة على وجود طفيل *Theileria spp.* وهذه النتيجة تتوافق مع ما ذكره Schnitger et al. (2004). وبينت الدراسة وجود تتابع جيني (5' TGTCAAGGAGGCCTCAAATTA 3') و (5' TTTGACTTTGAATAGGCTGCC 3') عند الباند ٢٧٥ عند الفحص لتعريف النوع *Th. annulata* كما أكدها (Schnitger et al. (1998) و Shayan et al. (2000). وأظهرت الدراسة نتائج إيجابية عند التتابع الجيني

جدول رقم ١: التسلسل الجيني sequences للبانادات المستخدمة primers في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

■ للبانادات Primers المستخدمة في التجربة وأعطت نتائج إيجابية.

□ للبانادات Primers المستخدمة في التجربة ولم تعط نتائج إيجابية.

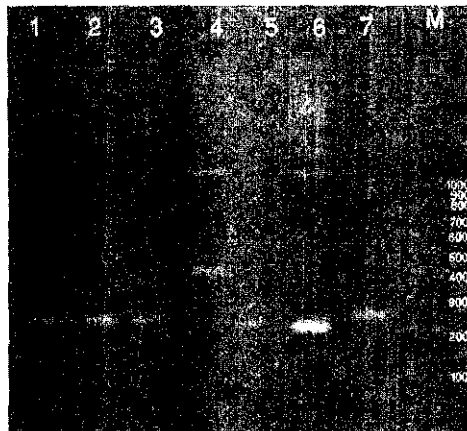
الرقم	المرجع	Names of primers	Nucleotide sequences (5-3)	PCR- PROD UCT
P1	Shayan <i>et al.</i> 1998, Schnittger <i>et al.</i> 2000	<i>Th. annulata</i> sense and <i>T. annulata</i> -antisense	5' TGTC AAGGAGGCCTCAAATTA 3'	275 bp
P2	Shayan and Rahbari, 2005		5' TTTGACTTTGAAATAGGCTGCC 3'	
P3		<i>Th. lestoquardi</i> - sense	5' GTTACTCTCACTTCATGTGAG 3'	669 bp
P4		<i>Th. lestoquardi</i> - antisense	5' GGAGA ACTTGTCGACAGCTGG 3'	
P5	Shayan and Rahbari, 2005	<i>Babesia</i> -sense	5' CAGGATTGCTTTTCGAACAAAG 3'	239 bp
P6		<i>Babesia</i> -antisense	5' CCTTGACATAACCGGCGAGG 3'	
P7	Schnittger <i>et al.</i> 2004	18S rRNA gene sense	5' CACAGGGAGGTAGTGACAAG 3'	426-430 bp (Theil.)
P8	Shayan and Rahbari, 2005	18S rRNA gene antisense	5' AAGAATTCACCTCTGACAG 3'	389-402 bp Bab.
P9		Seminested primer for <i>T. lestoquardi</i>	5' ATTGCTTGTGTCCTCCG 3'	235 bp
P10		For <i>B. ovis</i>	5' TCGCGCGGCCCTTTGCGT 3'	181 bp
P11		For <i>B. motasi</i>	5' GCTTGCTTTTGTACTTTG 3'	179 bp
P12	Clausen <i>et al.</i> (1998)	<i>Trypanosoma vivax</i>	CAGTGCTCCCGCTCGTACACGGAC	266 bp
P13			GCACGCCACATAGCCGGGGAACAG	
P14	Moser <i>et al.</i> (1989)	<i>Trypanosoma brucei</i>	CGAATGAATAATTAACAATGCCGAG	173 bp
P15			T TAACGCTATTATACACAAT	
P16			AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC	
P17			ACACATTAACACTAAAGAACAG	
P18	Moser <i>et al.</i> (1989)	<i>Trypanosoma congolense</i> <i>avannah</i>	TCGAGCGAGAACGGGCACCTTGCGA	339 bp
P19			GTTTTCGATGAAAATTAGGGACAAA CAAATCCCGCACA	
P20	Masiga <i>et al.</i> (1992)	<i>Trypanosoma congolense</i> Forest	GGACACGCCAGAAGGTACTT	350 bp
P21			GTTCTCGACCAAATCCAAC	



1	2	3	4	5	6	7	M
-	+	+	-	-	-	-	1000
-	-	-	-	-	-	-	900
-	-	-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	-	-	500
+	+	+	+	+	-	-	400
-	-	-	-	-	-	-	300
-	-	-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	-	-	100

شكل أ وجدول ٢ (عينات الأغنام عند الباندات (Primers P8-P9).
 العينات من ٢ و٣ مصابة Babesia عند اكبر من ٤٠٠ pb والعينات ٤ و٥ مصابة بـ Theileria عند اكبر من ٤٠٠ pb
 ورقم ٢ و٣ باند عند اكبر من ١٠٠٠ pb
 أما الرقم ٦ لم يعطي أي نتيجة ايجابية للإصابة
 M = مقدار الوزن الجزيئي.

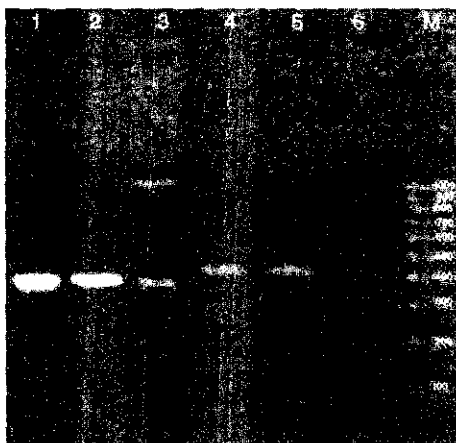
شكل ١ : صورة توضيحية لجل تفاعل البلمرة المتسلسل يوضح تواجد الطفيليات الأولية الدموية.



1	2	3	4	5	6	7	M
-	-	-	-	-	-	-	1000
-	-	-	-	-	-	-	900
-	-	-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	-	-	500
-	-	-	-	-	-	-	400
-	-	-	-	-	-	-	300
+	+	+	+	+	+	-	235
-	-	-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	-	-	100

شكل ب وجدول ٣ (عينات الجمال عند الباندات (Primers P8-P9)
 العينات من ٢ و٣ مصابة Babesia عند ٢٣٥ pb والعينة ٤ و٥ و٦ مصابة بـ Theileria عند ٢٣٥ pb
 الرقم ٧ لم يعطي أي نتيجة ايجابية للإصابة
 M = مقدار الوزن الجزيئي.

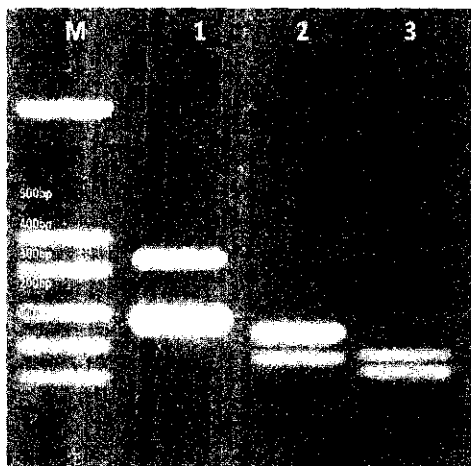
شكل ٢ : صورة توضيحية لجل تفاعل البلمرة المتسلسل يوضح تواجد الطفيليات الأولية الدموية.



1	2	3	4	5	6	7	M
-	-	-	-	+	-	-	1000
-	-	-	-	-	-	-	900
-	-	-	-	-	-	-	800
-	-	-	-	-	-	-	700
-	-	-	-	-	-	-	600
-	-	-	-	-	-	-	500
-	-	+	+	+	+	-	400
-	-	-	-	-	-	-	300
-	-	-	-	-	-	-	200
-	-	-	-	-	-	-	100

شكل جـ وجدول ٤: عينات الماعز عند الباندات (Primers P8-P9)
 العينات من ٢ او لم يعطي أي نتيجة ايجابية للإصابة العينة ٣ مصابة بـ Babesia عند اكبر من ٤٠٠ pb
 والعينات ٤ و ٥ و ٦ مصابة بـ Theileria عند اكبر من ٤٠٠ pb
 ورقم ٥ باند عند اكبر من ١٠٠٠ pb
 M = مقدار الوزن الجزيئي.

شكل ٣: صورة توضيحية لجل تفاعل البلمرة المتسلسل يوضح تواجد الطفيليات الأولية الدموية.



٣	٢	١	M
-	-	-	1000
-	-	-	900
-	-	-	800
-	-	-	700
-	-	-	600
-	-	-	500
-	+	+	400
-	-	-	300
-	-	+	275
-	+	-	239
-	-	-	200
+	+	-	181
+	-	-	179

شكل د وجدول ٥: عينات الدم عند الباندات (Primers P1-P5-P7-P10-P11):
 العينة الأولى: يشير الباند إلى الإصابة بـ Theileria spp. عند اكبر من ٤٠٠ pb، بينما يشير الباند الثاني عند ٢٧٥ bp إلى جنس T. annulata.
 العينة الثانية: يشير الباند إلى الإصابة بـ Babesia spp. عند ٢٣٩ pb، بينما يشير الباند الثاني عند ١٨١ bp إلى جنس B. ovis. العينة الثالثة:
 يشير الباند ١٨١ bp إلى B. ovi، بينما يشير الباند الثاني عند ١٧٩ bp إلى جنس B. motasi.
 M = مقدار الوزن الجزيئي.

شكل ٤: صورة توضيحية لجل تفاعل البلمرة المتسلسل يوضح تواجد الطفيليات الأولية الدموية.

جدول رقم ٧: يوضح الإصابات المختلفة بأنواع الطفيليات الدموية للعوامل المختلفة.

Trypanosoma			Babesia			Theileria			العائل
T. sp.	T. congolense	T. vivax	B. sp.	B. motasi	B. ovis	Th. Sp.	Th. lestoquardi	Th. annulata	
--	+	+	--	+	+	--	--	+	جمال
--	+	--	+	--	--	--	+	+	أغنام
--	+	--	+	--	--	--	+	+	ماعز

- Hilpertshauer, H.; Deplazes, P.; Schnyder, M.; Gern, L. and Mathis, A. 2006. Babesia spp. Identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. Appl Environ Microbiol. 72:6503-6510.
- Hussein, H.S.; Al-Asqah, N.A.; Al-Khalifa, M.S. and Diab, F.M. 1991 The Blood Parasite of Indigenous Livestock in Saudi Arabia. Arab Gulf J. Scient. Res. 9:143-160.
- Kirvar, E.; Ilhan, T.; Katzer, F.; Hooshmand-Rad, P.; Zweygarth, E.; Gerstenberg, C.; Phipps, P. and Brown, C. 2000. Detection of Theileria annulata in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. Parasitology. 120: 245-299.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G. F., Loeblich, A. E., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprangue, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. Journal of Protozool, 27: 37-58.
- Li, F.J.; Zheng, J.Y.; Jia, W.Z. and Lun, Z.R. 2005. Analysis of molecular profiles among Trypanozoon species and subspecies by MGE-PCR method. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 30; 23(5):277-359.
- Masiga, D.K.; Smyth, A.J.; Hayes, P.; Bromidge, T.J. and Gibson, W.C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. Int. J. Parasitol. 22, 909-918.
- Mazyad, S. and Khalaf, S. 2002. Studies on theileria and babesia infecting live and slaughtered animals in Al Arish and El Hasanah, North Sinai Governorate, Egypt. J. Egypt Soc Parasitol. 32:601-611.
- Moser D.R., Cook G.A.; Ochs D.E., Bailey C.P., McKane M.R. and Donelson J.E. 1989. Detection of Trypanosoma congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology. 99:57-66.
- Nagore, D; Garcia-Sanmartin, J; Garcia-Perez, A.L.; Juste, R.A. and Hurtado, A. 2004. Identification, genetic diversity and

المراجع

- Aktas, M.; Altay, K. and Dumanli, N. 2005. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats. Vet Parasitol. 5:13: 277-358.
- Aktas, M.; Altay, K. and Dumanli, N. 2007. Determination of prevalence and risk factors for infection with Babesia ovis in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. Parasitol Res. 100: 797-802.
- Allsopp, M.T. and Allsopp, B.A. 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some Babesia species. Ann N Y Acad Sci. 1081:509-526.
- Al-Mohammed H.I., 2006. Parasitological and immunological studies on rats experimental infected with Saudi Arabian strain of Trypanosoma evansi. J Egypt Soc Parasitol. 36:363-71
- Altay, K.; Dumanli, N. and Aktas, M. 2007. Molecular identification, genetic diversity and distribution of Theileria and Babesia species infection small ruminants. Vet Parasitol. 147: 161-166.
- Ceci, L.; Jangejan, F.; Carelli, G.; Tassi, P. and Sparagano, O. 1999. Identification of Theileria buffeli/ orientalis and Babesia bigemina in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. Parasitologia. 41: 31-33.
- Clausen, P.-H., Wiemann, A., Patzelt, R., Kakaire, D., Poetzsch, C., Peregrine, A., Mehlitz, D., 1998. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of Trypanosoma spp. In naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. Ann. N. Y. Acad. Sci. 849, 21-31.
- D' Oliveira, C.; van der Weide, M.; Habela, M.; Jacquiet, P. and Jongejan, F. 1995. Detection of Theileria annulata in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol. 33: 2665-2674.
- Hashemi-Fesharki, R. 1997. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vector in Iran. Parasitologia. 39: 115-122.

- Shayan, P.; Biermann, R.; Schein, E.; Gerdes, J. and Ahmed, J. 1998. Detection and differentiation of *Theileria annulata* and *Theileria parva* using macroschizont-derived DNA probes. *Ann N Y Acad Sci* **29**:88-95. Quoted by: (Shayan and Rahbari, 2005]
- Simukoko, H.; Marcotty, T.; Phiri, I.; Geysen, D.; Vercruyse, J. and Van den Bossche, P. 2007. The comparative role of cattle, goats and pigs in the epidemiology of livestock trypanosomiasis on the plateau of eastern Zambia. *Vet. Parasitol.* **147**: 231-239.
- Singh, N.; Pathak, K.M. and Kumar, R. 2004. A comparative evaluation of parasitological, serological and DNA amplification methods for diagnosis of natural *Trypanosoma evansi* infection in camels. *Vet Parasitol.* **30**:126(4):365-438.
- Teglas, M.; Matern, E.; Lein, S.; Foley, P.; Mahan, S.M. and Foley, J. 2005. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet. Parasitol.* **15**: 131119-146.
- Theodoropoulos, G.; Gazouli, M.; Ikononopoulos, J.A.; Kantzoura, V. and Kominakis A. 2006. Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia* in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. *Vet. Parasitol.* **30**:135(2):99-104.
- Thill, C., Backenson, P.B.; Prusinski, M.A.; Kogut, S.J.; Lee, J.H. and Coleman, J.L. 2005. Detection of *Babesia microti* DNA in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) by use of Chelex 100 resin and polymerase chain reaction. *J. Med. Entomol.* **42**: 694-700.
- Tomassone, L.; Pagani, P. and De Meneghi, D. 2005. Detection of *Babesia caballi* in *Amblyomma variegatum* ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in the Republic of Guinea. *Parassitologia* **47** (2): 247-298.
- Torina, A.; Vicente, J.; Alongi, A.; Scimeca, S.; Turla, R.; Nicosia, S.; Di Marco, V.; Caracappa, S. and de la Fuente, J. 2007. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. *Zoonoses Public Health*. **54**; 8-15.
- Wojcik-Fatla, A.; Cisak, E.; Chmielewska-Badora, J.; Zwolinski, J.; Buczek, A. and Dutkiewicz, J. 2006. Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med.* **13**: 319-341.
- Zhang, Z. Q. and Baltz, T. 1994. Identification of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma brucei brucei* using repetitive DNA probes. *Vet Parasitol.* **53**: 197-208.
- Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol.* **34**: 1059-1126.
- Njiru, Z.K.; Constantine, C.C.; Gitonga, P.K.; Thompson, R.C. and Reid, S.A. 2007. Genetic variability of *Trypanosoma evansi* isolated detected by inter-simple sequence repeat anchored-PCR and microsatellite. *Vet Parasitol.* **20**:247(1-2):51-60.
- Njiru, Z.K.; Constantine, C.C.; Masiga, D.K.; Reid, S.A.; Thompson, R.C. and Gibson, W.C. 2006. Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infect Genet Evol.* **6**: 292-300.
- Omer, O.H.; Magzoub, M.; Haroun, E.M.; Mahmoud, O.M. and Abdel Hamid, Y.M. 1998. Diagnosis of *Trypanosoma evansi* in Saudi Arabian camels (*Camelus dromedaries*) by the passive haemagglutination test and Ag-ELISA. *Zentralbl Veterinarmed B.* **45**:627-660.
- Papadopoulos, B. (1999): Cattle and small ruminant piroplasmiasis in Macedonia, Greece. *Parassitologia*. **41**: 81-85.
- Pieniazek, N.; Sawczuk, M. and Skotarczak, B. 2006. Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *J Parasitol.* **92**:32-37.
- Quintao-Ailva, M.G.; Melo, M.N. and Ribeiro, M.F. 2007. Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bugemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Zoonosis Public Health*. **54**: 147-198.
- Savini, G.; Conte, A.; Semproni, G. and Scaramozzino, P. 1999. Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports. *Parassitologia*. **41**: 95-100.
- Schnittger, L.; Hong, Y.; Jianxun, L.; Ludwig, W.; Shayan, P.; Rahbari, S.; Voss-Holtmann, A. and Ahmed, J. 2000. Phylogenetic analysis by rRNA comparison of the highly pathogenic sheep-infecting parasites *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species identified in China. *Ann N Y Acad. Sci.* **916**: 271-275.
- Schnittger, L.; Shayan, P.; Biermann, R.; Mehlhorn, H.; Gerdes, J. and Ahmed, J. 2000. Molecular genetic characterization and subcellular localization of *Theileria annulata* mitochondrial heat-shock protein 70. *Parasitol Res* **86**:444-452. Quoted by: (Shayan and Rahbari, 2005)
- Shayan, P. and Rahbari, S. 2005. Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. *Parasitol. Res.* **97**:281-287.

Isolation of Protozoa Infecting Blood of Animals In Eastern Area of Saudi Arabia by using PCR-RALF

Souad M. Alsaqabi and Sara A. Aljubran

University Of Dammam, College Of Science ,Department Of Biology section Zoology

(Mailing Address: Saudi Arabia, P.O. Box 838 Postal Code 31113, University Of Dammam, Dammam

ABSTRACT

External parasites infection is one of the most important factors that cause disease outbreak in farm animals. The present study included examination of blood samples for primary blood parasites transmitted to farm animals by ticks. The study recorded three species : *Babesia. motasi*, *Babesia. ovis*, *Trypanosoma. congolense*, *Theileria. lestoquardi*, *Theileria. annulata*, *Trypanosoma. vivax*. It showed accuracy and sensitivity of the polymerase chain reaction (PCR) test to detect and identify of blood parasites types. Also the study showed the need to use PCR technology to develop a genetic fingerprinting all of species that infect local animals and types of blood parasites in Saudi Arabia which are difficult to identify in terms of their types accurately by conventional methods. This study is considered the first in this field.