

중합효소연쇄반응을 이용한 *Theileria sergenti*의 신속한 검출

최은진¹⁾, 강승원^{1)*}, 권창희¹⁾, 정우석¹⁾, 윤용덕¹⁾, 송희종²⁾

농촌진흥청 수의과학연구소¹⁾, 전북대학교 수의과대학²⁾

초록: *Theileria sergenti*의 진단방법으로 Giemsa 염색에 의한 광학현미경적 관찰이 가장 통상적으로 이용되고 있으나, 감염이 아주 저거나 내과성인 경우 검출하기가 매우 곤란하다. 이에 PCR 진단을 위한 대상유전자로서 p33의 염기서열을 이용하여 4개의 oligonucleotide primers: TS1, TS2, TS3, TS4를 작성하였다. 작성된 primer의 각 조합에 따라 PCR한 결과 TS1과 TS4 조합에서는 499 bps, TS1과 TS3 조합에서는 381 bps, TS2와 TS4 조합에서는 365 bps, TS2와 TS3 조합에서는 247 bps 크기의 산물을 획득하였다. 이 PCR 산물은 p33 유전자 염기서열 분석을 통한 제한효소처리 및 Southern blot hybridization 방법을 통하여 그 특이성을 확인하였다. Primer의 특이성을 조사한 결과 미감염 백혈구 및 다른 주혈기생충인 *Babesia ovata*, *Anaplasma marginale*에 대해서는 교차 반응을 나타내지 않았다. 또한 야외시료에 PCR 기법을 적용한 결과 Giemsa 염색에 의한 광학현미경적 관찰에서는 64.8%의 양성물을 보인 반면, PCR 진단에서는 본 실험에서 작성된 TS1과 TS4, TS2와 TS3 조합이 공히 88.7%의 양성물을 나타내었다.

서 론

우리 나라 전 지역에 걸쳐 거의 대부분의 소에 감염되어 있는 *Theileria sergenti*는 진드기 매개성 주혈원충이다(Chon, 1970; Son et al., 1972; Chon, 1978; Lee and Kim, 1987). 이 원충에 감염된 소는 일반적으로 식욕부진, 발열, 빈혈, 황달 등의 임상증상을 보이고, 특히 분만, 수송, 착유, 고온 등과 같은 스트레스나 다른 합병증이 있으면 최악, 비유량 감소, 발육부진 등이 나타나며, 심한 경우 폐사하기도 한다(Chon, 1970; Kim and Son, 1984).

현재까지 *T. sergenti* 진단은 광학 및 전자현미경적 관찰법(Baek et al., 1990 & 1993)과 혈청학적 진단법(Kobayashi et al., 1987; Ohgitani et al., 1987; Yoshihara et al., 1990)이 주로 이용되었지만 매우 낮은 감염과 잠복성, 내과성 감염인 경우 검출하기가 어려운 단점을 갖고 있다. 그리하여 최근 *T. sergenti* 총체의 특이 DNA probe를 이용한 Southern blot hybridization(Kajiwara et al.,

1990; Matsuba et al., 1992 & 1993; Chae et al., 1996), dot blot(Kajiwara et al., 1990; Hirano and Kirisawa, 1991; Tanaka et al., 1992) 등의 분자생물학적 기법을 도입한 진단법이 연구되고 있으며, *T. sergenti*의 DNA를 특이적으로 증폭하여 단시간 내에 진단하는 PCR 방법(Kawazu et al., 1992; Tanaka et al., 1993)이 신속, 정확한 진단방법으로서 활용되고 있다.

이에 본 실험은 국내 표준 *T. sergenti*의 염기서열을 바탕으로(Kang et al., 1997) 한국주에 특이적인 primer를 작성하고, 이를 이용한 PCR 진단 기법을 확립함으로써 보다 신속 정확한 *T. sergenti*의 검출 방법을 개발하고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 가검시료

농촌진흥청 축산기술연구소에서 사육되고 있는 소 71두로부터 채혈한 혈액을 도말표본제작하여 Giemsa 염색 후 광학현미경으로 *T. sergenti*를 검경한 다음 공식재료로서 실험에 사용하였다.

2. 표준원충주

농촌진흥청 수의과학연구소에서 계대중인 *T. sergenti*(성환주, 1981)를 분양받아 실험에 사용하

• 논문접수 1997년 2월 6일, 수정후 채택 1997년 5월 9일

*책임 저자

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers for the amplification of *T. sergenti*

Primer	Nucleotide sequences (location in the p33 gene)	Ratio of Purine:Pyrimidine
TS1 (forward)	5'-CCAAGTTCACCCCAACTGTCG-3' (5'-256 - 276-3')	8 : 13
TS2 (forward)	5'-CAGTACCTCGATGAAGTTGTA-3' (5'-390 - 410-3')	11 : 10
TS3 (reverse)	5'-CGAGTCTTACGACTTTCTTCT-3' (5'-636 - 616-3')	6 : 15
TS4 (reverse)	5'-GCACTGTTTCATGGCGTGCAAA-3' (5'-753 - 734-3')	11 : 10

였다.

3. Oligonucleotide primer 제조

국내분리 *T. sergenti*주에서 분석한 KTHP33의 DNA 염기서열(Kang et al., 1997)을 토대로 4개의 primer(TS1, TS2, TS3, TS4)를 합성하여 oligonucleotide purification cartridge(OPC grade)로 정제하였다(Table 1).

4. *T. sergenti* DNA 분리

DNA 분리는 Persing et al.(1992)의 방법에 준하여 실시하였다. 약술하면, EDTA로 처리된 혈액에서 백혈구와 혈장을 제거한 적혈구에 TE buffer(10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA)를 첨가하여 vortex한 후 16,000 g로 4°C에서 20분간 4회 원심세척하였다. 각각의 침전물에 proteinase K 10 µg이 포함되어 있는 K buffer(50 mM Tris, 1.5 mM MgCl₂, 0.45% NONIDET P-40, 0.45% Tween 20, pH 8.3) 200 µl씩을 첨가하여 55°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 곧바로 95°C에서 10분간 inactivation시켰다. 이를 ice bath에서 급속 냉각후 16,000 g로 20분간 원심하여 상층액을 제거하고 침전된 DNA를 TE buffer 30 µl로 재부유시켜 실험에 사용하였다.

5. PCR

PCR은 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 100 pM primers (forward 및 reverse), Taq DNA polymerase 2.5 unit와 template DNA 500 ng이 함유된 반응혼합액 50 µl를 94°C에서 5분간 denaturation을 유도하고 57°C에서 20초, 72°C에서 1분 20초, 94°C에서 30초씩 30회를 반복 실시한 후 72°C에서 10분간 더 polymerization하였다. PCR 반응이 끝난 시료는 1.6% agarose gel에서 전기영동한 후 transilluminator(Spertroline, Model TR-312A)로 증폭산물을 검사하였다.

6. PCR 산물의 특이성 조사

제한효소 분석과 Southern blot hybridization에 의한 특이성 조사: TS2와 TS3 primer 조합에 의해 증폭된 PCR 산물은 국내분리주의 p33 유전자 염기서열에서 확인되었던 제한효소 *Msp* I으로

특이성을 조사하였다. 약술하면, PCR 산물 12 µl, enzyme 2 µl, buffer 2 µl씩 혼합한 다음 총 20 µl가 되도록 증류수를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

그외 PCR산물은 Southern blot hybridization을 이용하여 특이성을 조사하였다. Probe는 크로닝된 p33 유전자를 이용, Dig DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim Co.)로 labeling하여 사용하였다. Hybridization은 각각의 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 0.25 M HCl 용액에 적용한 다음 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl, 1 M CH₃COONH₄/0.02 N NaOH 용액에 차례로 적용시켰다. 이 gel을 nylon membrane(Stratagene, U.S.A.)에 transfer한 후 3분간 ultraviolet으로 cross-linking하였다. 이 membrane에 prehybridization 용액(0.1% N-laurolysarco sine, 0.02% SDS, 5X SSC)를 넣고 1시간 동안 prehybridization시킨 다음 hybridization 용액과 labeling DNA를 넣어 68°C에서 overnight하였다. Washing buffer로 세척한 다음 membrane에 anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate를 넣고 반응시켜 NBT(nitroblue tetrazolium)과 X-phosphate용액으로 발색시켰다.

Primer 조합에 의한 PCR 교차반응성 조사: 작성한 primer sets에 의한 PCR에서 교차반응이 성립하는 지를 알아보기 위하여 다음과 같이 대조군을 설정하였다. 양성대조군은 수의과학연구소 계대우의 혈액, 즉 적혈구와 백혈구를, 음성대조군으로는 *T. sergenti*가 감염되어 있지 않은 소의 적혈구와 백혈구, 그리고 *B. ovata*, *A. marginale*를 이용하였고, DNA 분리 및 PCR 조건은 *T. sergenti* PCR 조건과 동일한 조건으로 실시하였다.

7. Primer 조합에 의한 PCR 진단효율 비교 분석

가검시료 71두의 혈액을 Kawazu et al.(1992)이 보고한 primer(K primer라 명명함)와 새로 작성한 TS1과 TS4(C1이라 명명함), TS1과 TS3(C2라 명명함), TS2와 TS4(C3라 명명함), TS2와 TS3(C4라 명명함) primer의 조합으로 전술한 바와 동일한 방법으로 PCR을 실시하였다.

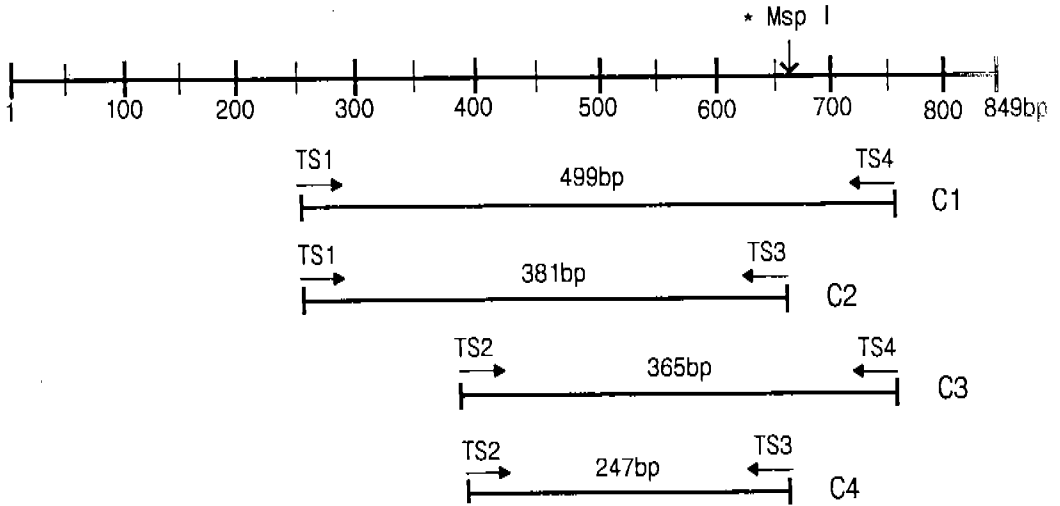


Fig. 1. Design of primer sets for diagnosis on *T. sergenti* by PCR.
 *Restriction endonuclease site with p33 gene is indicated

결 과

1. Primer 작성 및 각 조합에 따른 PCR

총 283개의 open reading frame 중에서 염기서열 256에서 276번째, 390에서 410번째, 616에서 636번째, 그리고 734에서 754번째를 선택하여 각각 21 mer씩 oligonucleotide primer를 작성하였고 이를 각각 TS1, TS2, TS3, TS4로서 분류하여 실험에 사용하였다.

이와 같은 primer를 각각 조합하여 국내 표준 원충주(성환주, 1981)의 DNA를 PCR한 결과 C1 조합에서는 499 bps, C2 조합에서는 381 bps, C3 조합에서는 365 bps, C4 조합에서는 247 bps의 PCR 산물을 검출할 수 있었다(Fig. 1).

2. PCR 산물의 특이성 조사

제한효소 및 Southern blot hybridization에 의한 특이성 조사: C4 primer에 의한 PCR을 *Msp* I으로 처리하였던 바 2개의 fragment로 절단되어 그 특이성이 인정되었으며(Fig. 2). C1, C2, C3 primer를 이용한 PCR 산물은 작성된 특이 probe로 Southern blot를 실시한 결과 모두 양성 반응을 보였다(Fig. 3).

Primer 조합에 의한 교차반응성 조사: *T. sergenti*에 감염되지 않은 소의 적혈구 및 백혈구, 그리고 다른 주혈 원충인 *B. ovata*, *A. marginale* 등의 DNA에 새로 작성한 primer를 적용한 결과 모두 음성반응을 보였으며, 감염된 소의 적혈구 및 백혈구에서는 양성반응을 나타내었다(Fig. 4).

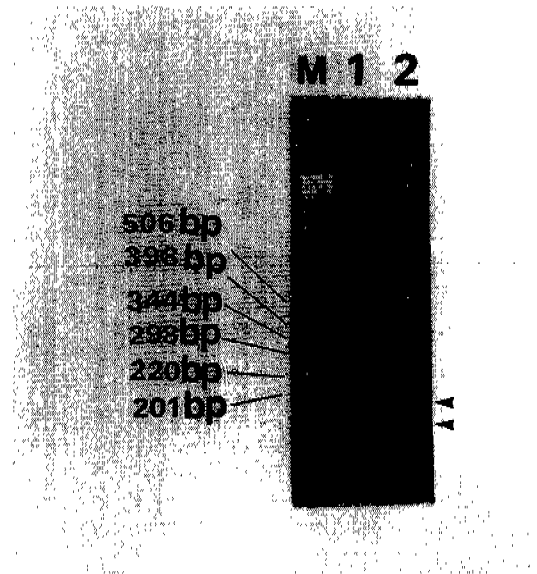


Fig. 2. Specificity of PCR product with C4 primer set by restriction enzyme (*Msp* I) digestion. M; 1 Kb DNA ladder, lane 1; standard Korean isolate, lane 2; two fragments cutting by *Msp* I

3. Primer 조합에 의한 PCR 진단효율 분석

Giemsa 염색하여 광학현미경으로 검정한 결과 71두 중 46두가 *T. sergenti*의 parasitemia (64.8% 양성률)를 보였고, K primer로 PCR한 결과 11두만이 음성(84.5% 양성률)을 나타내었다

(Table 2 & Fig. 5). 그러나 새로 작성한 primer의 각각의 조합으로 PCR한 결과 C1 primer에서는 63두, C2 primer에서는 61두, C3 primer에서는 62두, C4 primer에서는 63두가 양성을 나타내어 K primer에 의한 PCR 진단효율이 각각 4.2, 1.4, 2.8, 4.2%씩 증가하였다(Fig. 6).

고 찰

최근 일본에서는 *Theileria sergenti*를 진단 동정하기 위하여 piroplasm surface protein 중 p33/32 유전자를 증폭하여 다른 *Theileria*와 구별하는 PCR 기법을 도입 적용하고 있다(Kawazu et al., 1992 & 1995; Tanaka et al., 1993; Kubota et al., 1995). 그러나 Kang et al.(1997)의 보고에 의하면 KTHP33 염기서열과 Kawazu et al.이 보고한 염기서열이 약간의 차이가 나타나고 있어 일본의 PCR 기법을 그대로 적용할 경우 진단 오차를 초래할 수 있다고 판단되었다. 또한 한국에

서도 Chae et al.(1996)이 *T. sergenti* 진단을 PCR 기법으로 시도하였으나 증폭된 PCR 산물의 크기가 128 bp로서 너무 작아 확인하는데 있어서 고농도의 순수한 agarose gel 사용과 DNA 분리에 장시간 소요 등 개선의 여지가 있다고 판단되었다. 이에 본실험에서는 Kang et al.(1997)에 의해 보고된 KTHP33의 염기서열을 바탕으로 한국주에 더 특이적으로 작용할 수 있는 primer 작성 및 시간단축과 경제성을 갖춘 PCR 기법을 확립하고자 하였다.

먼저 혈액으로부터 *T. sergenti* DNA 검출과 PCR 반응 및 PCR 산물 확인까지의 전 과정에 소

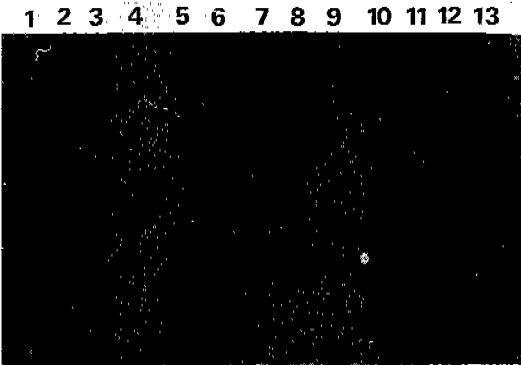


Fig. 3. Specificity of PCR products by southern blot using digoxigenin-labeled standard *T. sergenti* p33 DNA (Korean isolate). **a:** PCR products using TS2 and TS4 primer, **b:** PCR products using TS1 and TS4, **c:** PCR products using TS1 and TS3 primer, **d:** PCR products using TS2 and TS3 primer. Lane 1, 4, 7, 10; standard Korean isolate, lane 2, 8, 12; No. 37, lane 3; No. 34, lane 5, 11; No. 42, lane 6, 13; No. 15, lane 9; No. 1, a: 365 bps, b: 499 bps, c: 381 bps, d: 247 bps.

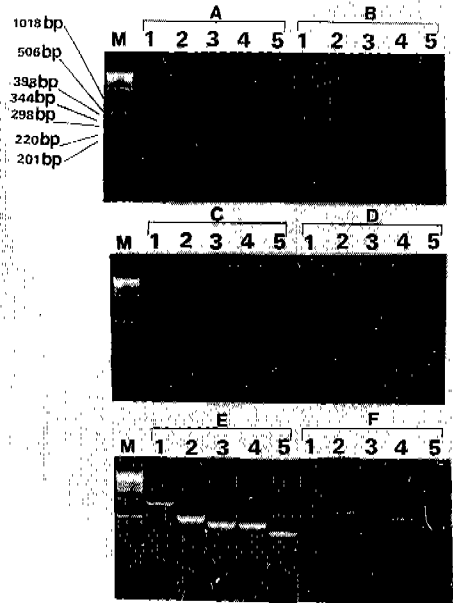


Fig. 4. Specificity of PCR using primers with specimens from *T. sergenti*-uninfected leukocytes, *A. marginale*, and *B. ovata*. **A:** *B. ovata*, **B:** *A. marginale*, **C:** *T. sergenti*-uninfected erythrocytes, **D:** *T. sergenti*-uninfected leukocytes, **E:** *T. sergenti*-infected erythrocytes, **F:** *T. sergenti*-infected leukocytes. Lane 1; PCR products using Ka1 and Ka2 primer, lane 2; PCR products using TS1 and TS4 primer, lane 3; PCR products using TS1 and TS3 primer, lane 4; PCR products using TS2 and TS4 primer, lane 5; PCR products using TS2 and TS3 primer.

Table 2. Comparison of the PCR and microscopic examination for diagnosis of *T. sergenti* infection

Diagnostic method	Positive	Negative	Total	Detection rate (%)
Microscopy	46	25	71	64.8
PCR	60	11	71	84.5

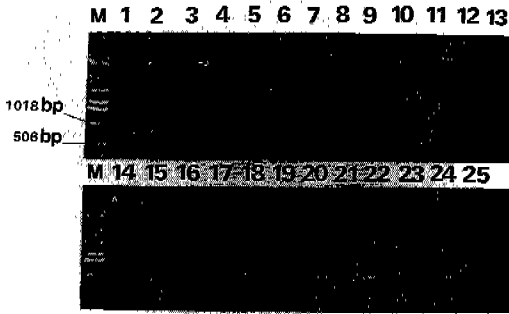


Fig. 5. Detection of *T. sergenti*-negative infection by PCR. M: 1Kb DNA ladder, lane 1-25; No. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 24, 26, 28, 33, 35, 37, 41, 42, 43, 44.

요되는 시간을 최대한 단축하고자 Tanaka *et al.*(1993)과 Matsuba *et al.*(1992), 그리고 Sambrook *et al.*(1989)의 방법과는 달리 Persing *et al.*(1992)의 방법에 준하여 *T. sergenti* DNA를 추출하였다. 그러나 이 방법은 buffy coat 층을 따로 분리 제거하지 않고 전혈을 사용하기 때문에 원충 DNA 이외에 백혈구의 DNA도 함께 분리될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 새로 작성한 primer의 특이성을 검사하기 위한 방법으로 *T. sergenti*에 감염되지 않은 적혈구 및 백혈구의 DNA를 각각 분리하고, 또한 감염된 소의 적혈구 및 백혈구의 DNA도 분리하여 PCR을 실시하였다. PCR 결과, 감염되지 않은 적혈구 및 백혈구에서는 전혀 반응이 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서는 작성한 primer와 소 백혈구 DNA간에 상동성이 없는 것으로 판단되어 Persing *et al.*(1992)의 방법에 아무런 문제점이 없는 것으로 규명되었다.

DNA 증폭을 위한 PCR 조건 또한 K primer를 한국주에 Kawazu *et al.*(1992)이 보고한 PCR 조건 즉, 94°C에서 1분, 58°C에서 2분, 72°C에서 3분을 25회 반복하는 조건을 그대로 적용한 바 PCR 증폭이 매우 불규칙하였다. 그리하여 본 실험에서는 PCR 조건을 94°C에서 30초, 57°C에서 20초, 72°C에서 1분 20초를 30회 반복으로 조건을 달리하여 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 또한 Kawazu *et al.*(1992)이 보고한 primer로 PCR한 결과 81.7%의 검출율을 나타내었지만 본 실험에서 작성 사용한 primer sets는 88.7%로서 보다 민감한 검출율을 관찰할 수 있었다.

*T. sergenti*에 감염된 소 중에서는 다른 원충의 혼합 감염 형태를 보이는 경우가 많이 있다. 이에 새로이 작성한 primer가 다른 주혈 원충과도 반응하는 지를 확인하기 위하여 PCR를 실시하였다. 그 결과 *A. marginale*, *B. ovata*에 모두 음성을 보여 TS1, TS2, TS3, TS4 primer가 *T. sergenti*의

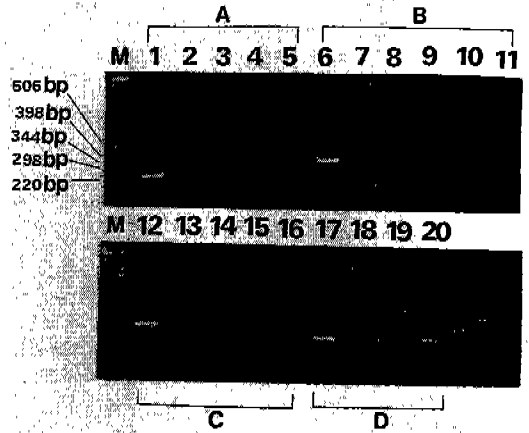


Fig. 6. Detection of *T. sergenti* by PCR using different sets of primers. M: 1 Kb DNA ladder, A: PCR products using TS2 and TS3 primer, B: PCR products using TS1 and TS3 primer, C: PCR products using TS1 and TS4 primer, D: PCR products using TS2 and TS4 primer. Lane 1, 6, 12, 17, No. 1, lane 2, 7, 13; No. 15, lane 3, 9, 14, 19; No. 37, lane 4, 10, 15; No. 42, lane 8, 18; No. 34, lane 5, 11, 16, 20: standard Korean isolate.

DNA에 대해서만 특이적으로 작용하는 것이 판명되어 교차반응이 나타나지 않음을 규명하였다.

한편 아시아나 호주에서 거론되고 있는 *T. sergenti*, *T. buffeli*, *T. orientalis* 등 종간의 진단 조건은 추후 고려되어야 할 과제로서 사료된다. 그리고 본 실험에서 규명된 TS1, TS2, TS3, TS4 primer의 특이성은 *Theileria* spp.의 진단과 함께 소 범안열원충종의 역학적, 분류학적 연구에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

Baek BG, Kim BS, Lee HY (1990) Fine structure of *Theileria sergenti* merozoite in Korean native cattle. *Korean J Vet Res* **30**: 465-471.
 Baek BG, Yhim BM, Lee YJ, *et al.* (1993) Study on infection of *Theileria sergenti* in neonatal calves. *Korean J Vet Res* **33**: 665-671.
 Chae JS, Lee JM, Kwon OD, Lee SO, Chae KS, Onuma M (1996) Comparative analyses of *Theileria sergenti* isolated from Korea and Japan by Southern hybridization and polymerase chain reaction. *Koeran J Vet Res* **36**(1): 187-193.
 Chae JS, Lee JM, Kwon OD, Park JH, Chae KS (1996) Rapid detection of *Theileria sergenti* by the polymerase chain reaction in Korean

- cattle. *Koeran J Vet Res* **36**(1): 195-207.
- Chon Y (1970) Hematological survey on hematozoa of cattle in Korea. *Res Rep off RDA* **13**: 81-87.
- Chon Y (1978) A survey on bovine theileriasis in Korea. *Res Rep off RDA* **20**: 1-3.
- Hirano A, Kirisawa R (1991) Evaluation of high sensitive DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *J Vet Med Sci* **53**: 933-935.
- Kajiwara N, Kirisawa R, Onuma M, et al. (1990) Specific DNA probe for the detection *Theileria sergenti* infection in cattle. *Jpn J Vet Sci* **52**: 1199-1204.
- Kang SW, Choi EJ, Kweon CH (1997) Cloning and sequencing of p33 in a Korean isolate of *Theileria sergenti*. *Korean J Parasitol* **35**(2): 105-110.
- Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K (1992) Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface protein of *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **56**(1): 169-175.
- Kawazu S, Kamio T, Sekizaki T, Fujisaki K (1995) *Theileria sergenti* and *T. buffeli* polymerase chain reaction based marker system for differentiating the parasite specific from infected cattle blood and infected tick salivary gland. *Exp Parasitol* **81**(4): 430-435.
- Kim YC, Son JY (1984) Studies on the change of blood and dairy quantity after delivery of *T. sergenti*-infected dairy cattle in the stock farm parasitic on ticks. *Korean J Ani Sci* **26**: 137-144.
- Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. (1987) Monoclonal antibodies against intra-erythrocytic merozoites (piroplasms) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* **49**: 697-702.
- Kubota S, Sugimoto C, Onuma M (1995) A genetic analysis of population in *Theileria sergenti* stocks and isolates using allele specific polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* **57**(2): 279-282.
- Lee JM, Kim MC (1987) Studies on the effective diagnosis and treatment of bovine piroplasmosis. *Korean J Vet Res* **27**: 321-330.
- Matsuba T, Kawahami Y, Iwai H, et al. (1992) Genomic analysis of *Theileria sergenti* stocks in Japan with DNA probes. *Vet Parasitol* **41**: 35-43.
- Matsuba T, Kubota H, Tanaka M, et al. (1993) Analysis of mixed parasite populations of *Theileria sergenti* using cDNA probes encoding a major piroplasm surface protein. *Parasitol* **107**: 369-377.
- Ogitani T, Okabe T, Sasaki N (1987) Antigenic properties of *Theileria sergenti* in ELISA serodiagnosis. *Jpn J Vet Sci* **49**: 531-534.
- Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford SR, Spielman A, Thormford JW, Conrad PA (1992) Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**(8): 2097-2103.
- Tanaka M, Matsuba T, Onoe S, et al. (1992) Biotin-labeled genomic DNA probe for detection of *Theileria sergenti* and its nucleotide sequence. *J protozool Res* **2**: 34-39.
- Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, et al. (1993) Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol* **31**: 2565-2569.
- Yoshihara K, Nakamura Y, Fujisaki K, et al. (1990) Bovine monoclonal antibody specific to *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* **52**: 1333-1335.

=Abstract=

Rapid detection of *Theileria sergenti* by polymerase chain reaction

Eun-Jin CHOI¹⁾, Seung-Won KANG¹⁾*, Chang-Hee KWEON¹⁾, Woo-Seog JEONG¹⁾,
Yong-Dhuk YOON¹⁾ and Hee-Jong SONG²⁾

National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea¹⁾, Department of Infectious Disease,
School of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea²⁾

Four separate pairs of oligonucleotide primers within the coding region in a *T. sergenti* 33-kDa surface protein gene were selected to detect *T. sergenti* by PCR. The specificity of PCR-amplified DNA was examined by digestion with restriction enzyme and Southern blot hybridization using *T. sergenti* p33 DNA probe. PCR appears to be specific for *T. sergenti*, without detectable signals from uninfected erythrocytes, uninfected bovine leukocytes and other hemoparasites, including *A. marginale* and *B. ovata*. Although 46 of 71 specimens (64.8 %) from grazing cattle were microscopically positive, PCR in this study showed that 64 specimens (88.7%) were positive. Therefore, PCR proves a useful diagnostic tool for detecting *T. sergenti*-infected cattle. In addition, it is also revealed that PCR was significantly more sensitive than traditional microscopic examination using Giemsa's stain.

Key words: *Theileria sergenti*, specificity, sensitivity, polymerase chain reaction

[Korean J. Parasitol. 35(2): 111-117, June 1997]

*Corresponding author