Veterinary Clinical Pathology, Vol.14, No. 54, Summer 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2020.1892944.1258**

Prevalence and risk factors of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle in northwestern Iran

Ghadimipour, R.[*1], Noaman, V.[2], Taghizadeh, M. [3]

1- Assistant Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Marand, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Parasitology Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
[*]Corresponding author's email: R.Ghadimipour@rvsri.ac.ir
(Received: 2020/2/10 Accepted: 2020/9/13)

Abstract

This study was designed to investigate the epidemiological distribution of *B. bovis* and *B. bigemina* using molecular method and related risk factors in a number of cattle in northwestern Iran. For this purpose, 153 blood samples were randomly collected in the East and West Azarbaijan provinces. The extracted DNA from blood cells was analyzed using a set of primers derived from the 18s rRNA gene for members of the genera Babesia by polymerase chain reaction (PCR). A semi-nested PCR technique was used for the identification of *B. bovis* and *B. bigemina* species. Based on the results of the present study, out of 153 blood samples, 39 (25.49%) were infected with a species of Babesia protozoan parasite, one of which was simultaneously infected with both Babesia species, and *B. bovis* and *B. bigemina* were detected in 38 (97.43 %) and 2 (5.12 %) samples, respectively. Our findings showed a high prevalence of *B. bovis* in comparison with *B. bigemina* in the animals (24.83% vs. 1.30%). In present research, the prevalence of Babesia species in West Azarbaijan province was significantly higher than that in East Azarbaijan (70% vs. 30%). Risk factors analysis revealed that although statistically significant differences in the prevalence of the Babesiosis were observed based on climate, season, flock management, feeding and race ($p<0.05$) but the effect of age, gender, and tick burden was not statistically significant. Our data provide valuable information regarding the epidemiology of *B. bovis* and *B. bigemina* infection in cattle in northwestern Iran which will likely be very beneficial for the management and control programs of the disease.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Babesia, Cattle, Risk factors, East Azarbaijan, West Azarbaijan, Iran.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2020.1892944.1258

بررسی شیوع انگل‌های خونی *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* در تعدادی از گاوهای منطقه شمال‌غرب ایران به روش مولکولی و ارزیابی عوامل خطر مرتبط با عفونت ناشی از آن‌ها

رحیم قدیمی‌پور*[۱]، وحید نعمان[۲]، مرتضی تقی‌زاده[۳]

۱- استادیار بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرند، ایران.
۲- دانشیار بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳- استادیار بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: R.ghadimipour@rvsri.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۹/۶/۲۳)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی مولکولی توزیع اپیدمیولوژیک *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* و عوامل خطر مربوطه در تعدادی از گاوهای منطقه شمال‌غرب ایران طراحی گردید. بدین منظور، ۱۵۳ نمونه خون به‌طور تصادفی از گاوهای استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA سلول‌های خونی، یک جفت پرایمر حاصل از ژن 18s rRNA برای شناسایی اعضای جنس بابزیا با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reaction; PCR) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور شناسایی گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* از تکنیک PCR نیمه‌آشیانه‌ای (semi-nested PCR) استفاده شد. براساس یافته‌های این مطالعه، از مجموع ۱۵۳ نمونه خونی، ۳۹ نمونه (۲۵/۴۹ درصد) آلوده به گونه‌ای از انگل تک‌یاخته بابزیا بودند که یکی از نمونه‌ها به‌طور هم-زمان به دو گونه بابزیا آلوده بود. همچنین گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* به ترتیب در ۳۸ و ۲ مورد از نمونه‌ها شناسایی شد. نتایج حاکی از میزان بالای شیوع آلودگی به *بابزیا بوویس* نسبت به *بابزیا بایژمینا* در دام‌های تحت‌آزمایش بود (۲۴/۸۳ درصد در مقابل ۱/۳۰ درصد). از طرف دیگر، میزان شیوع گونه‌های بابزیا در استان آذربایجان‌غربی به‌مراتب بیشتر از استان آذربایجان‌شرقی بود (۷۰ درصد در مقابل ۳۰ درصد). در بررسی فاکتورهای خطر هم مشخص گردید با این‌که شرایط اقلیمی، فصل نمونه‌برداری، نوع مدیریت دامداری، نوع تغذیه دام‌ها و نژاد آن‌ها تاثیر معنی‌داری بر میزان شیوع بابزیوز در حیوانات مورد مطالعه داشت ($p<0/05$) ولی این تاثیر در مورد سن و جنس دام‌ها و حضور ناقلین بندپا معنی‌دار نبود ($p>0/05$). یافته‌های مطالعه حاضر اطلاعات ارزشمندی در مورد اپیدمیولوژی عفونت ناشی از *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* در گاوهای منطقه شمال‌غرب ایران ارائه می‌دهد که می‌تواند برای برنامه‌های مدیریت و کنترل این بیماری بسیار مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: بابزیا، گاو، فاکتورهای خطر، آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، ایران.

مقدمه

بابزیوز (Babesiosis) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز ناشی از کنه می‌باشد. *بابزیا بوویس* (*Babesia bovis*) و *بابزیا بایژمینا* (*Babesia bigemina*) به‌عنوان مهم‌ترین گونه‌های انگلی مسبب بابزیوز گاوی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مطرح هستند و خسارت اقتصادی قابل‌توجهی را به صنعت دامپروری وارد می‌کنند. با این‌همه، عفونت با *بابزیا بوویس* اغلب شدیدتر از *بابزیا بایژمینا* بوده و منجر به تلفات بالا در گاوهای حساس می‌شود (Terkawi *et al*., 2011).

مشاهده میکروسکوپی انگل‌های تک‌یاخته عامل بابزیوز در گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا به همراه بررسی علایم بالینی، متداول‌ترین روش در تشخیص فرم حاد این بیماری است، اما به دلیل حساسیت پایین این روش در مراحل تحت‌بالینی و یا مزمن عفونت، استفاده از آن در مطالعات همه‌گیرشناسی محدود شده است. علاوه بر این، علائم بالینی بابزیوز بدون هموگلوبینوری به تیلریوز مشابه است و تفریق اشکال گرد و کوچک بابزیا با اشکال پیروپلاسمایی تیلریا در گسترش خونی رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا نیاز به مهارت و تجربه آزمایشگر دارد (Wagner *et al*., 2002). از سوی دیگر، در کشورهای مختلف، آزمون‌های سرولوژی متفاوتی در مطالعات همه‌گیرشناسی بابزیوز استفاده شده‌اند که در اکثر این روش‌ها واکنش متقاطع گونه‌های بابزیا قابل‌تفریق نبوده و نتایج منفی و مثبت کاذب نیز عموماً در این آزمون‌ها مشاهده می‌شود. از طرفی روش‌های سرمی در شناسایی دام‌های آلوده در فاز اولیه عفونت و عفونت‌های مزمن در دام‌های حامل با تعداد پایین انگل در خون محدودیت دارند (Chaudhry *et al*., 2010). شناسایی دام‌های حامل بابزیا اهمیت خاصی در کنترل و پیشگیری بیماری دارد زیرا این دام‌ها به‌عنوان مخزن، در انتقال آلودگی به دام‌های حساس بسیار اهمیت دارند. تحقیقات اخیر، حساسیت و ویژگی بالاتر تکنیک‌های تشخیص مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reaction; PCR) را در شناسایی انگل‌های خونی نسبت به روش‌های سرولوژیکی و میکروسکوپی نشان داده‌اند (Passos *et al*., 1998; Wagner *et al*., 2002). این تکنیک‌ها علاوه بر تشخیص دقیق گونه‌ها تمایز گونه‌ای را نیز امکان‌پذیر ساخته‌اند. حساسیت و ویژگی بالای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سبب شده است که این روش برای تأیید نتایج حاصل از آزمون‌های تشخیصی دیگر و تأیید سلامت حیوان برای صادرات، به‌کار برده شود (Rajabi *et al*., 2017). یکی از ژن‌های بکاررفته در تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژنی مربوط به جزء 18S rRNA است که در تحقیقات مختلف جهت شناسایی جنس و گونه‌های بابزیا با موفقیت استفاده شده است. قطعه بسیار متغیر V4 این ژن دارای تنوع قابل ملاحظه‌ای است که می‌توان از آن به‌منظور طراحی پرایمرهای اختصاصی گونه‌های بابزیا مخصوصا *بابزیا بایژمینا* و *بابزیا بوویس* استفاده نمود (Gubbels *et al*., 1999; Georges *et al*., 2001; Shayan and Rahbari, 2005).

تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر شناسایی انگل‌های خونی بویژه گونه‌های بابزیا و ناقلین آن‌ها در نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ از کشورهای مختلف دنیا و نیز ایران ارائه شده‌است (Terkawi *et al*., 2011; Gharekhani and Tavassoli, 2012; Hoghooghi-Rad *et al*., 2013; Aktas and Ozubek, 2015; Khaki

et al., 2015; Mahmoudvand *et al*., 2019). با این‌همه، مطالعات انجام‌شده در خصوص شناسایی انگل بابزیا و بابزیوزیس در ایران عمدتاً معطوف به نشخوارکنندگان کوچک بوده و مرور پژوهش‌های موجود حاکی از وجود گزارش‌های اندکی از وضعیت اپیدمیولوژیک بابزیوز گاوی در کشور است که به سهم خود می‌تواند در جلوگیری از توسعه صنعت دامپروری نقش بسزایی داشته‌باشد (Ziapour *et al*., 2011; Khamesipour *et al*., 2015). همچنین در اکثر بررسی‌های انجام‌یافته در ایران شناسایی انگل بر اساس مشاهده میکروسکوپی گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده انجام شده است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف شناسایی گونه‌های شایع تک‌یاخته بابزیا در گاوهای استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی واقع در شمال‌غرب ایران و بررسی تاثیر فاکتورهای خطر بر توزیع شیوع این انگل با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، انجام گردید.

مواد و روش‌ها

- **جمع‌آوری نمونه‌های خون**: تعداد ۱۵۳ نمونه خون به‌طور تصادفی از گاوهای به‌ظاهر سالم در مناطق مختلف استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی واقع در شمال‌غرب ایران در طول سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. از هر دام ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ و به لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (آوا، ایران، لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری حاوی EDTA، ethylene diamine tetra acetic acid) منتقل گردید. نمونه‌ها پس از کدگذاری و درج مشخصات دام، در شرایط سرد (۲ الی ۵ درجه سلسیوس) به آزمایشگاه انگل‌شناسی بخش پژوهش‌های دامپزشکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شمال‌غرب کشور منتقل گردیدند. هم‌زمان، اطلاعات کامل دام‌های تحت-بررسی در فرم‌های مخصوصی ثبت گردید (جداول ۱ و ۲). تمام نمونه‌های خون تا زمان انجام بررسی‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند.

- **استخراج DNA از نمونه‌های خون**: به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های خونی مورد آزمایش، پس از خارج نمودن آن‌ها از فریزر، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و از کیت تجاری مخصوص استخراج DNA از خون و بافت‌های انسان و حیوانات (MBST، ایران، کد K38/87، شماره ساخت ۲۷۰۷٤) براساس توصیه شرکت سازنده آن استفاده شد.

- **ارزیابی کمی DNA استخراج‌شده**: جهت ارزیابی کمی و کیفی صحت عملکرد کیت استخراج DNA، ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به همراه محلول سنگین‌کننده حاوی برم تیمول بلو و گلیسیرین (سیناکلون، ایران، 6x loading dye) و در کنار نردبان ژنی (سایز مارکر) ۱۰۰ جفت بازی (bp) (سیناکلون، ایران) بر روی ژل آگارز ۱ درصد (سیناکلون، ایران) در محلول بافر TBE (سیناکلون، ایران،-0.5X Tris-borate EDTA) با دستگاه الکتروفورز (پایا پژوهش، ایران، مدل HUE-16S) و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ٦۰ دقیقه (پایا پژوهش، ایران، مدل EPS-600Z) الکتروفورز شده و باندهای تشکیل‌شده در دستگاه ژل‌داک (Kodak، ایالات متحده آمریکا) مشاهده گردید.

- **آزمایشات PCR**: در مطالعه حاضر جهت شناسایی انگل خونی جنس بابزیا در نمونه‌های مورد آزمایش، با استفاده از آزمایش PCR، یک قطعه از منطقه بسیار متغیر

V4 که برروی ژن 18S rRNA ژنوم انگل مذکور قرار دارد، به کمک یک جفت پرایمر اختصاصی برای قطعه فوق (جدول ۱)، مورد تکثیر قرارگرفت (Shayan and Rahbari, 2005). واکنش PCR استفاده‌شده نیز با حجم نهایی۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده 2x (سیناکلون، ایران، حاوی PCR buffer، $MgCl_2$، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ۵/۵ میکرولیتر آب DEPC (diethylpyrocarbonate)، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناکلون، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده انجام گردید. برنامه دمایی آزمایش PCR نیز در جدول ۱ ارائه شده است (Shayan and Rahbari, 2005). در نهایت هم محصولات PCR مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش و نیز نمونه آلوده به بابزیا به‌عنوان شاهد مثبت (تهیه‌شده از بخش تحقیقات بیماری‌های انگلی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران) و نمونه مربوط به خون غیرآلوده به‌عنوان شاهد منفی، در کنار نردبان ژنی (سایزمارکر) ۱۰۰ جفت بازی و در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر رنگ ایمن (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شده و در دستگاه ژل‌داک (Kodak، ایالات متحده آمریکا) باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید. لازم به ذکر است که در ژل الکتروفورزشده مذکور، در صورت مشاهده باندی با اندازه حدود ۴۳۰ جفت باز، نمونه موردنظر مثبت در نظر گرفته می‌شد.

در ادامه جهت تشخیص گونه‌های مورد نظر از جنس بابزیا، نمونه‌هایی که در آزمایش PCR اول از نظر وجود انگل خونی بابزیا مثبت تشخیص داده شدند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه *بابزیا بایژمینا* (Gubbels *et al.*, 1999) و گونه *بابزیا بوویس* (Georges *et al.*, 2001) (جدول ۱) و با بهره‌گیری از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه‌آشیانه‌ای (semi-nested PCR) مورد ارزیابی قرارگرفتند. این واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده 2x (سیناکلون، ایران، حاوی PCR buffer، MgCl2، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ۸ میکرولیتر آب DEPC، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناکلون، ایران) و ۰/۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اولیه انجام گردید (Gubbels *et al.*, 1999; Georges *et al.*, 2001). برنامه دمایی این واکنش نیز در جدول ۱ ارائه شده است. پس از الکتروفورز DNAهای تکثیریافته (محصول PCR) در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (bp)، بر روی ژل آگارز ۱ درصد، در محلول بافر TBE و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه، در صورت مشاهده باندهای ۲۱۰ و ۱۳۲ جفت بازی، نمونه‌های مربوطه به ترتیب آلوده به *بابزیا بایژمینا* و *بابزیا بوویس* در نظر گرفته می‌شدند.

جدول ۱- ردیفِ پرایمرهای مورد استفاده و برنامه دمایی PCR برای تائید جنس بابزیا و گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا*

پرایمر اختصاصی	نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر (´۳-´۵)	طول محصول (bp)	سیکل‌ها		دما (°C)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل‌ها	منبع
جنس *بابزیا*	ThBab F ThBab R	*18S rRNA*	CACAGGGAGGT AGTGACAAG AAGAATTTCACC TCTGACAG	۴۳۰	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱	A
					سیکل دوم	واسرشته سازی	۹٤	٤٥	۳۵	
						اتصال	٥٦	٤٥	۳۵	
						تکثیر	۷۲	٤٥	۳۵	
					سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	٦۰۰	۱	
گونه *بابزیا بوویس*	*B. bovis* F (Semines ted PCR)	*18S rRNA*	CAGGTTTCGCCT GTATAATTGAG	۱۳۲	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱	B
					سیکل دوم	واسرشته سازی	۹٤	۳۰	۳۵	
						اتصال	۵۸	۳۰	۳۵	
						تکثیر	۷۲	۳۰	۳۵	
					سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۳۰۰	۱	
گونه *بابزیا بایژمینا*	*B. bigemina* F (Semines ted PCR)	*18S rRNA*	CGTTTTTTCCCTT TTGTTGG	۲۱۰	سیکل اول	واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱	C
					سیکل دوم	واسرشته سازی	۹٤	۳۰	۳۵	
						اتصال	۵۳	۳۰	۳۵	
						تکثیر	۷۲	۳۰	۳۵	
					سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۳۰۰	۱	

A. Shayan and Rahbari, 2005
B. Georges *et al*., 2001
C. Gubbels *et al*., 1999

همچنین جدول توزیع شیوع دو گونه بابزیا فوق در دام‌های تحت‌بررسی، بر اساس فاکتورهای خطر تهیه و ارائه شد (جدول ۳).

- **تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج حاصله، به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفتند. جهت محاسبه فراوانی داده‌ها و نیز به‌منظور تشخیص معنی‌دار بودن اختلافات آماری بین

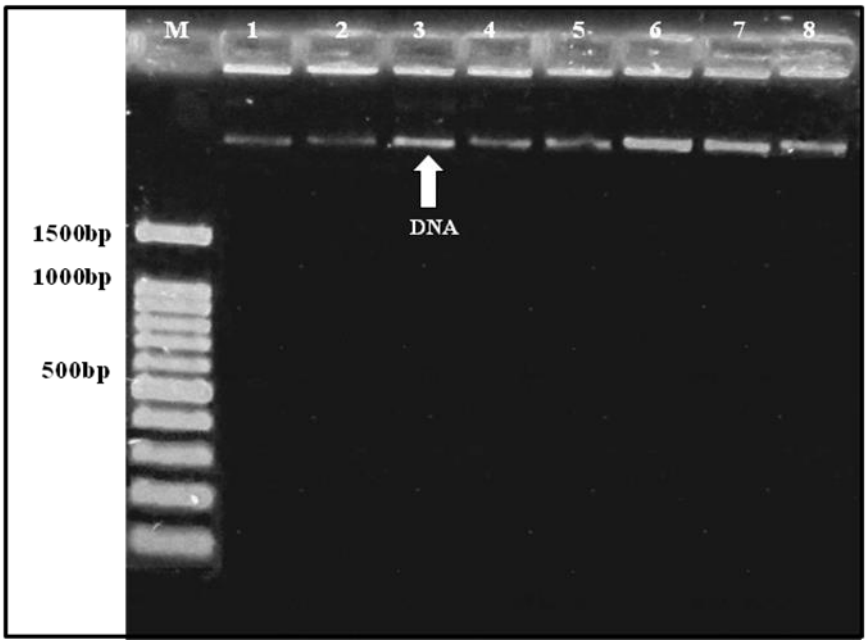
فراوانی‌های مذکور، از آزمون مربع‌کای (Chi square test) استفاده شد. همچنین $p<۰/۰۵$ مبنای معنی‌داری اختلافات آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

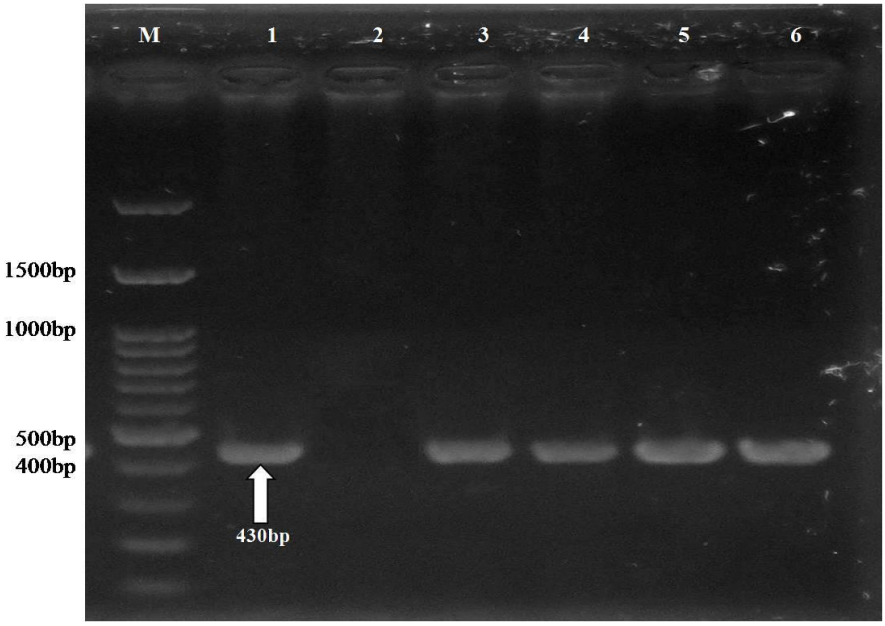
الکتروفورز اکثر DNAهای استخراج‌شده حاکی از صحت آزمایش استخراج و کیفیت خوب نمونه‌ها برای استفاده در آزمایش PCR بود (شکل ۱). از مجموع ۱۵۳ نمونه خون، ۳۹ نمونه (۲۵/۴۹ درصد) آلوده به تک-یاخته بابزیا تشخیص داده‌شدند. همچنین به ترتیب ۳۸ (۹۷/۴۳ درصد) و ۲ (۵/۱۲ درصد) مورد از این نمونه‌ها از نظر *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* مثبت بوده و حاکی از آلودگی به‌ترتیب ۲۴/۸۳ و ۱/۳۰ درصدی دام‌های تحت‌مطالعه به ارگانیسم‌های فوق‌الذکر بود. البته یکی از نمونه‌های مذکور هم، به‌طور هم‌زمان حاوی هر دو گونه *بابزیای* مورد بررسی بود. نمونه‌های آلوده به *بابزیا بوویس* بر اساس فراوانی به ترتیب مربوط به شهرهای خوی (۱۴ جدایه، ۳۶/۸۴ درصد) و میاندوآب (۱۲ جدایه، ۳۱/۵۷ درصد) در استان آذربایجان‌غربی، و مرند (۸ جدایه، ۲۱/۰۵ درصد) و ملکان (۴ جدایه، ۱۰/۵۲ درصد) در استان آذربایجان‌شرقی بوده و اختلاف آماری بین این فراوانی‌ها معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). این در حالی‌است که *بابزیا بایژمینا* فقط در دام‌های شهرستان خوی تشخیص داده‌شد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۲ و اشکال ۲ تا ۴).

جدول ۲- نتایج مربوط به شناسایی مولکولی گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* از مجموع ۱۵۳ نمونه خون حاصل از گاوهای استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی در طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶

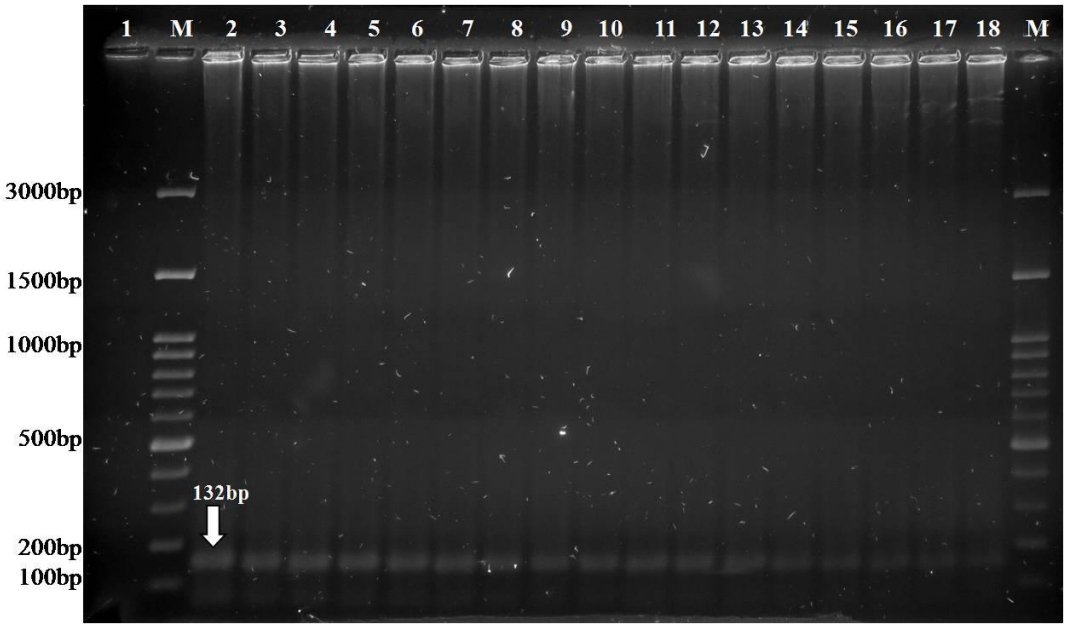
استان مورد نظر	شهر مورد نظر (شهر)	تعداد نمونه اخذشده	موارد مثبت جنس بابزیا تعداد (درصد)	موارد مثبت گونه *بابزیا بوویس* تعداد (درصد)	موارد مثبت گونه *بابزیا بایژمینا* تعداد (درصد)
آذربایجان‌شرقی	ملکان	۴۰	۴ (۱۰/۰۰)	۴ (۱۰۰)	۰ (۰/۰۰)
	مرند	۱۸	۸ (۴۴/۴۴)	۸ (۱۰۰)	۰ (۰/۰۰)
	عجب‌شیر	۶	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)
	بناب	۱۰	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)
آذربایجان‌غربی	میاندوآب	۱۸	۱۲ (۶۶/۶۶)	۱۲ (۱۰۰)	۰ (۰/۰۰)
	خوی	۳۸	۱۵ (۳۹/۴۷)	۱۴ (۹۳/۳۳)	۲ (۱۳/۳۳)
	ارومیه	۱۵	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)
	سلماس	۸	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)
مجموع	-	۱۵۳	۳۹ (۲۵/۴۹)	۳۸ (۹۷/۴۳)	۲ (۵/۱۲)
جمع کل	-	۱۵۳	۳۹ (۲۵/۴۹)	۳۸ (۲۴/۸۳)	۲ (۱/۳۰)



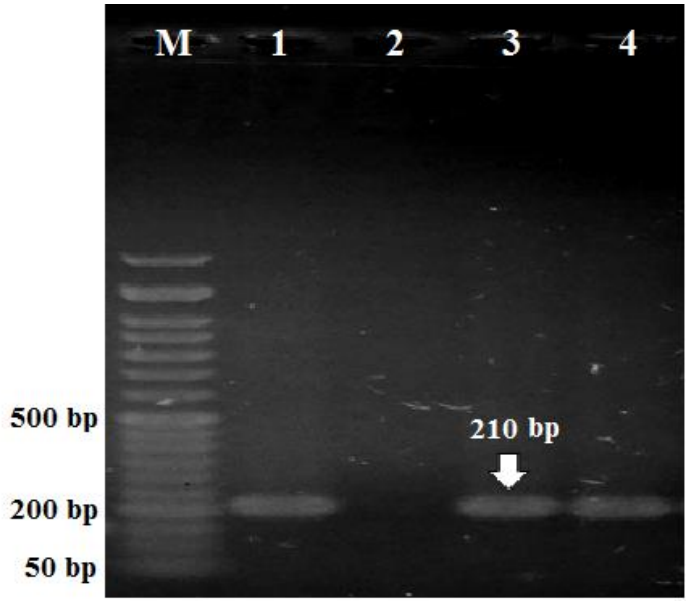
شکل ۱- الکتروفورز نمونه‌های DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد، رنگ‌آمیزی‌شده با رنگ ایمن. چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، چاهک‌های ۸-۱: DNAهای استخراج‌شده مربوط به سلول‌های هسته‌دار خون که با متلاشی شدن سلول‌های قرمز و سفید خون، چنان‌چه ژنوم اجرام بابزیایی تحت‌بررسی نیز در سلول‌های مذکور وجود داشته‌باشد، در DNA استخراجی حضور خواهند یافت.



شکل ۲- عکسی از ژل الکتروفورزشده محصولات PCR ساده. چاهک M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱: شاهد مثبت جنس بابزیا، چاهک ۲: شاهد منفی (نمونه مربوط به خون غیرآلوده)، چاهک‌های ٦-۳: نمونه‌های مثبت حاوی انگل بابزیا.



شکل ۳- عکسی از ژل الکتروفورزشده محصولات PCR نیمه آشیانه‌ای. چاهک‌های M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک۱: شاهد منفی(نمونه مربوط به خون غیرآلوده)، چاهک ۲: شاهد مثبت (نمونه آلوده به انگل *بابزیا بوویس*)، چاهک‌های ۱۸-۳: نمونه‌های آلوده به انگل *بابزیا بوویس*.



شکل ٤- عکسی از ژل الکتروفورزشده محصولات PCR نیمه آشیانه‌ای. چاهک M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک۱: شاهد مثبت (نمونه آلوده به انگل *بابزیا بایژمینا*)، چاهک ۲: شاهد منفی (نمونه مربوط به خون غیر آلوده)، چاهک‌های ۳ و ٤: نمونه‌های آلوده به انگل *بابزیا بایژمینا*.

بررسی فاکتورهای خطر نیز نشان داد که شرایط اقلیمی منطقه، فصل نمونه‌برداری، نژاد دام، نوع دامداری و نحوه تغذیه دام‌ها تاثیر معنی‌داری بر توزیع شیوع *بابزیا بوویس* در گاوهای مناطق مورد مطالعه دارند ($p<۰/۰۵$)، درحالی‌که در مورد گونه *بابزیا بایژمینا*، فاکتورهای تاثیرگذار شامل نژاد دام، مجاورت با

حیوانات وحشی و وضعیت تولید شیر بودند ($p<۰/۰۵$) (جدول۳).

جدول ۳- فراوانی گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* در نمونه‌های خون مربوط به تعدادی از گاوهای استان‌های آذربایجان‌شرقی و آذربایجان‌غربی در طی سال‌های ۱۳۹۷- ۱۳۹۶ براساس فاکتورهای خطر

فاکتورهای خطر	سطح مورد نظر	آلودگی به *بابزیا بوویس*					آلودگی به *بابزیا بایژمینا*				
		موارد مثبت		ضریب کا (2χ)	درجه آزادی (df)	*p*-value	موارد مثبت		ضریب کا (2χ)	درجه آزادی (df)	*p*-value
		تعداد	درصد				تعداد	درصد			
اقلیم	بیابانی	۵	۱۳/۲	۱۳/۴۹۲	۲	*۰/۰۰۱	۰	۰/۰	۰/۶۵۷	۲	۰/۷۲۰
	کوهستانی	۱۶	۴۲/۱				۱	۵۰/۰			
	جلگه‌ای	۱۷	۴۴/۷				۱	۵۰/۰			
فصل	پاییز	۰	۰/۰	۲۹/۶۰۶	۱	*۰/۰۰۰۱	۰	۰/۰	۳/۸۲۴	۱	۰/۰۵۱
	بهار	۲۷	۷۱/۱				۲	۱۰۰			
	تابستان	۱۱	۲۸/۹				۰	۰/۰			
	زمستان	۰	۰/۰				۰	۰/۰			
نوع دامداری	صنعتی	۱	۲/۶	۲۲/۸۲۷	۲	*۰/۰۰۰۱	۰	۰/۰	۰/۴۷۴	۲	۰/۷۸۹
	نیمه‌صنعتی	۱۶	۴۲/۱				۰	۰/۰			
	سنتی	۲۱	۵۵/۳				۲	۱۰۰			
نوع تغذیه	چرای آزاد	۰	۰/۰	۶/۳۲۰	۱	*۰/۰۱۲	۰	۰/۰	۰/۲۵۳	۱	۰/۶۱۵
	تغذیه داخل دامداری	۳۸	۱۰۰				۲	۱۰۰			
حضور ناقلین بندپا در دامداری	مگس‌های گزنده	۷	۱۸/۴	۲/۵۶۳	۲	۰/۲۷۸	۰	۰/۰	۰/۵۷۹	۲	۰/۷۴۹
	پشه‌های گزنده	۵	۱۳/۲				۰	۰/۰			
	کنه	۲۶	۶۸/۴				۲	۱۰۰			
واکسیناسیون	خیر	۳۸	۱۰۰	۰/۶۷۰	۱	۰/۴۱۳	۲	۱۰۰	۰/۰۲۷	۱	۰/۸۷۰
	بله	۰	۰/۰				۰	۰/۰			
مجاورت دامداری با حیوانات وحشی	خیر	۳۴	۸۹/۵	۱/۹۶۹	۱	۰/۱۶۱	۱	۵۰/۰	۷/۱۲۴	۱	*۰/۰۰۸
	بله	۴	۱۰/۵				۱	۵۰/۰			
نژاد	خارجی	۱۱	۲۸/۹	۹/۳۲۴	۲	*۰/۰۰۹	۲	۱۰۰	۸/۶۶۵	۲	*۰/۰۱۳
	دورگه	۲۶	۶۸/۴				۰	۰/۰			
	بومی	۱	۲/۶				۰	۰/۰			
سن	زیر یک سال	۴	۱۰/۵	۳/۲۴۷	۳	۰/۳۵۵	۰	۰/۰	۱/۹۴۹	۳	۰/۵۸۳
	یک تا سه سال	۲۱	۵۵/۳				۲	۱۰۰			
	سه تا پنج سال	۱۳	۳۴/۲				۰	۰/۰			
	بیشتر از پنج سال	۰	۰/۰				۰	۰/۰			
جنس	ماده	۳۳	۸۶/۸	۰/۵۲۷	۱	۰/۴۶۸	۲	۱۰۰	۰/۴۱۵	۱	۰/۵۲۰
	نر	۵	۱۳/۲				۰	۰/۰			
وضعیت تولید شیر	بالا	۴	۱۰/۵	۶/۲۶۳	۳	۰/۰۹۹	۱	۵۰/۰	۱۱/۶۸۳	۳	*۰/۰۰۹
	پایین	۷	۱۸/۴				۰	۰/۰			
	معمولی	۲۲	۵۷/۹				۱	۵۰/۰			
	بدون تولید شیر	۵	۱۳/۲				۰	۰/۰			

* $p<۰/۰۵$ مبنای اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته‌شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان شیوع *بابزیا بوویس* در گاوهای استان‌های شمال‌غربی ایران بسیار بالاتر از شیوع *بابزیا بایژمینا* در این استان می‌باشد (۲٤/۸۳ درصد در مقابل ۱/۳۰ درصد). همچنین مشخص گردید که میزان عفونت با گونه‌های بابزیا در گاوهای استان آذربایجان‌غربی به‌مراتب بالاتر از استان همجوار یعنی استان آذربایجان‌شرقی می‌باشد (۷۰ درصد در مقابل ۳۰ درصد) (جداول ۱ و ۲). در تحقیقات قبلی مشابه، میزان آلوگی بابزیایی گاوها در استان‌های مازندران ۱۸/۳ درصد (Ziapour *et al.*, 2011)، کردستان ۲/۱ درصد (Fakhar *et al.*, 2012)، چهارمحال و بختیاری و اصفهان به ترتیب ۷ و ٤ درصد (Khamesipour *et al.*, 2015)، منطقه دهگلان استان کردستان ۱۹/۹۷ درصد (Hasheminasab *et al.*, 2018) و استان آذربایجان غربی (مربوط به آلودگی به *بابزیا بایژمینا* و *بابزیا بوویس*) به ترتیب ۹۲/۵ و ۷/۵ درصد (Rajabi *et al.*, 2017) گزارش شده است. علاوه بر تفاوت‌های اکولوژیکی و حضور ناقلین بندپا در مناطق مختلف کشور که در میزان شیوع بیماری مؤثر هستند، یکی از دلایل وجود موارد مثبت بالای *بابزیا بوویس* در این مطالعه را می‌توان استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه‌آشیانه‌ای (semi-nested PCR) دانست که حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده دارد. میزان آلودگی گاوها به *بابزیابوویس* و *بابزیا بایژمینا* در دیگر کشورهای جهان، نظیر پاکستان به ترتیب ۱۱ و ۱۸ درصد (Chaudhry *et al.*, 2010)، ترکیه به ترتیب ۹ و ۱ درصد (Aktas and Ozubek, 2015)، تایلند به ترتیب ۱۱/۲ و ۳/٦ درصد (Terkawi *et al.*, 2011) و در پرتغال به ترتیب ۷۹ و ۵۲ درصد اعلام شده است (Silva *et al.*, 2009). نتایج متفاوت منعکس‌شده در مطالعات مختلف ممکن‌است به دلیل نمونه‌برداری تصادفی در یک مطالعه و نمونه‌برداری هدفمند از دام‌های دارای علائم بیماری در مطالعه دیگر و نیز تفاوت در روش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده باشد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و نتایج تحقیقات ذکرشده در نقاط مختلف، شیوع گونه‌های بابزیا در گاوهای منطقه شمال‌غرب ایران نسبتاً بالاست. بررسی‌های پیشین نیز به شیوع بالای بابزیوز و نه تیلریوز در مناطق سردسیر و دارای رطوبت نسبی بالا و واقع‌شده در عرض‌های جغرافیایی بالاتر ایران مانند استان مرکزی و آذربایجان‌های شرقی و غربی و شیوع اندک آن در استان‌های لرستان و خوزستان که گرمسیری بوده و عرض جغرافیایی پایینی دارند، اذعان کرده‌اند (Mahmoudvand *et al.*, 2019).

از طرف دیگر بر طبق نتایج جدول ۲ اگرچه فراوانی نسبی حضور گونه‌های *بابزیا بوویس* و *بابزیا بایژمینا* در گاوهای گروه سنی ۳-۱ سال بیشتر از سایر گروه‌های سنی و در جنس ماده بیشتر از جنس نر می‌باشد ولی نه سن و نه جنس، تاثیر معنی‌داری بر میزان شیوع بابزیوز در دام‌های مورد مطالعه نداشتند. در مطالعات انجام یافته بر روی گاوها، گوسفندان و بزهای شهر مشهد (Razmi *et al.*, 2006) و همچنین گوسفندان شهر اهواز (Jalali *et al.*, 2013) و نیز شترهای شهر زابل (Ranjbar Bahadori and Afshari Moghadam, 2009) هم ارتباط معنی‌داری بین سن و جنس میزبانان و شیوع انگل‌های خونی در آن‌ها مشاهده نگردید. بر این اساس به نظر می‌رسد، دام‌های تحت-

مطالعه از هر دو جنس نر و ماده نسبت بـه آلـودگی بـه بابزیا حساس هستند و به دلیل حضور نـاقلین بنـدپا در دامداری‌ها، سن در میزان حساسـیت ایـن حیوانـات بـه بابزیا نقش تاثیرگذاری نـدارد. بـا ایـن‌همـه، معنـی‌داری شیوع بالای این تک‌یاخته خونی در گاوهای بالای یـک سال و نیز دام‌های ماده نسبت بـه دام‌هـای جـوان و نـر استان آذربایجان‌غربی در ایران (Rajabi *et al*., 2017) و نیز در گاومیش‌های جوان نسبت به سایر گروه‌های سنی این دام در تایلند گزارش شده اسـت (Terkawi *et al*., 2011).

همچنین بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، میـزان عفونت با *بابزیا بوویس* در دامداری‌های سـنتی بـه‌طـور معنی‌داری بیشتر از دامداری‌های صنعتی و نیمـه‌صـنعتی بوده و حضور این تک‌یاخته کاملاً متأثر از نوع دامـداری و نوع تغذیه دام‌ها می‌باشد. در سایر مطالعات نیز میـزان شیوع بابزیوز در گله‌های کوچک گـاوهـا و گوسـفندان استان آذربایجان‌غربی بیشتر از گله‌های بـزرگ توصـیف شده‌است، هرچند که در هیچ‌یک از این مطالعات ارتباط معنی‌داری بـین انـدازه گلـه و شـیوع بیمـاری مشـاهده نگردیده است (Esmaeilnejad *et al*., 2015; Rajabi *et al*., 2017). به نظر می‌رسد رعایـت اصـول بهداشـتی از قبیل سم‌پاشی، مبارزه با جوندگان، واکسیناسیون دام‌هـا، کنترل ورود و خروج‌ها و رعایت مسائل ایمنـی زیسـتی در دامداری‌های صنعتی و نیمه‌صنعتی به‌مراتب بیشـتر از دامداری‌های سنتی و کوچک بوده و همـین موضـوع بـا میزان شیوع بیمـاری‌هـای تـک‌یاختـه‌ای ماننـد بـابزیوز ارتباط مستقیمی دارد.

از طرف دیگر یافته‌های ما مشخص نمود که شـیوع بابزیوز گـاوی در گلـه‌هـایی کـه نـاقلین بنـدپا از قبیـل مگس‌های گزنده، پشه‌های گزنده و به‌ویژه کنه‌ها حضور بالایی در آن‌ها دارند به‌مراتب بیشتر است. به‌طور مشابه، بررسـی عفونـت بابزیـایی در گاوهـا (Rajabi *et al*., 2017) و گوسـفندان (Esmaeilnejad *et al*., 2015) استان آذربایجان‌غربی در ایران و نیـز گوسـفندان کشـور یونان (Theodoropoulos *et al*., 2006) ارتباط مسـتقیم و معنی‌دار بین حضور ناقلین بندپا در گله و میزان شیوع این بیماری را نشان داده است.

همچنین نتایج جدول ۲، حکایت از تـاثیر معنـی‌دار شرایط اقلیمی منطقه و فصل نمونه‌بـرداری بـر فراوانـی نسبی حضور گونـه *بابزیـا بـوویس* در دام‌هـای تحـت-آزمایش داشت. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که فصـل، آب‌وهوا و نوع خـاک، جمعیـت نـاقلین بنـدپا و توزیـع جغرافیایی آن‌ها را تنظیم می‌کنند. در این ارتباط گزارش شده که در مناطق آب و هوایی جلگـه‌ای و کوهسـتانی، اوج فعالیت کنه‌ها بیشتر در فصـول بهـار و تابسـتان رخ می‌دهد (Yeruham *et al*., 1998). در مطالعه حاضر نیز بالاترین میزان شیوع عفونت بابزیایی در دام‌های منـاطق جلگه‌ای و کوهستانی (۸۷/۵ درصـد) و در فصـل بهـار (۷۲/۵ درصد) مشاهده شد که هم‌زمان با فعالیـت کنـه-های ناقل بالغ در منطقه است. بررسی‌های سایر محققین نیز نشان‌دهنده ارتبـاط تنگاتنـگ بـین افـزایش عفونـت گونه‌های بابزیا و فعالیت فصـلی کنـه‌هـای ناقـل اسـت (Yakhchali *et al*., 2011; Bakirci *et al*., 2012; Hasheminasab *et al*., 2018). به نظر می‌رسد در اکثـر موارد، فصل شیوع بابزیوز و سایر بیماری‌هـای ناشـی از انگل‌های تک‌یاخته‌ای خونی با فصل فعالیـت کنـه‌هـای ناقل مقارن بوده و این بیماری‌ها از بیماری‌هـای فصـلی محسوب می‌شوند که بیشترین میزان وقوع آن‌ها در ماه-

های خرداد، تیر و تا حدی مرداد می‌باشد. همسو با این یافته، بررسی شیوع بابزیوز در گاو، گوسفند و بزهای استان کردستان حاکی از جداسازی انگل در تمام طول سال است ولی بیشترین موارد مثبت بابزیوز در هر سه میزبان موردمطالعه مربوط به ماه‌های جون (خرداد)، جولای (تیر) و آگوست (مرداد) می‌باشد (Hasheminasab *et al.*, 2018).

بر طبق نتایج جدول ۲ تاثیر مجاورت با نشخوارکنندگان وحشی و وضعیت تولید شیر هم بر شیوع *بابزیا بایژمینا* در گاوها معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) ولی در مورد *بابزیا بوویس* غیرمعنی‌دار ($p>۰/۰۵$) بوده است. این در حالی است که نوع نژاد دام رابطه معنی‌داری با شیوع هر دو گونه بابزیا در آن‌ها داشت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که در نژادهای دورگه و خارجی فراوانی نسبی حضور هر دو گونه بابزیا بیشتر از نژاد بومی بود.

یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از آلودگی قابل توجه گاوهای منطقه شمال‌غرب ایران بویژه استان آذربایجان‌غربی به گونه‌های بابزیا علی‌الخصوص *بابزیا بوویس* است. مطالعه فاکتورهای خطر نیز نشان می‌دهد که شرایط اقلیمی منطقه، فصل نمونه‌برداری، نژاد دام، نوع دامداری و نحوه تغذیه دام‌ها تأثیر معنی‌داری بر شیوع عفونت بابزیایی در گاوهای مناطق موردمطالعه دارند. به نظر می‌رسد رعایت اصول بهداشتی و مسائل ایمنی زیستی در دامداری‌ها می‌تواند در کاهش خسارت اقتصادی ناشی از این قبیل بیماری‌های انگلی مؤثر باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری بی‌دریغ کارکنان بخش تحقیقات دامپزشکی معاونت پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شمال‌غرب کشور تقدیر و تشکر نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Aktas, M. and Ozubek, S. (2015). Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the Black Sea region, including the first report of Babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. Journal of Medical Entomology, 52(6): 1344-1350.
- Bakirci, S., Sarali, H., Aydin, L., Eren, H. and Karagenc, T. (2012). Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. Experimental and Applied Acarology, 56(2): 165-178.

- Chaudhry, Z.I., Suleman, M., Younus, M. and Aslim, A. (2010). Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. Pakistan Journal of Zoology, 42(2): 201-204.
- Esmaeilnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., Dalir-Naghadeh, B., Mardani, K., Golabi, M., *et al*. (2015). Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia ovis* in small ruminants from West Azerbaijan province, Iran, by Polymerase Chain Reaction. Journal of Arthropod-Borne Diseases, 9(2): 246-252.
- Fakhar, M., Hajihasani, A., Maroufi, S., Alizadeh, H., Shirzad, H., Piri, F., *et al*. (2012). An epidemiological survey on bovine and ovine Babesiosis in Kurdistan province, western Iran. Tropical Animal Health and Production, 44(2): 319-322.
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., *et al*. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. Veterinary Parasitology, 99(4): 273-286.
- Gharekhani, A. and Tavassoli, M. (2012). Survey on infestation to external parasites and their roles in transmission of protozoan disease in goat in Maku region. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 6(1): 1427-1434. [In Persian]
- Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., *at al*. (1999). Simultaneus detection of bovine *Theileria* and *Babesia* spp. by reverse line blot hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 37(6): 1782-1789.
- Hasheminasab, S.S., Moradi, P. and Wright, I. (2018). A four year epidemiological and chemotherapy survey of Babesiosis and Theileriosis, and tick vectors in sheep, cattle and goats in Dehgolan, Iran. Annals of Parasitology, 64(1): 43-48.
- Hoghooghi-Rad, N., Hashemi, S. and Abdigoudarzi, M. (2013). Detection of Theileriosis in vector ticks by Polymerase Chain Reaction method (PCR) in Lorestan province. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(26): 1828-1834. [In Persian]
- Jalali, S.M., Khaki, Z., Kazemi, B., Bandehpour, M., Rahbari, S., Razi Jalali, M., *et al*. (2013). Molecular detection and identification of Anaplasma species in sheep from Ahvaz, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 14(1): 50-56. [In Persian]
- Khaki, Z., Jalali, S.M., Kazemi, B., Razi Jalali, M. and Yasini, S.P. (2015). A study of hematological changes in sheep naturally infected with Anaplasma spp. and *Theileria ovis*: Molecular diagnosis. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 9(1): 19-26. [In Persian]
- Khamesipour, F., Doosti, A., Koohi, A., Chehelgerdi, M., Mokhtari-Farsani, A. and Chengula, A.A. (2015). Determination of the presence of Babesia DNA in blood samples of cattle, camel and sheep in Iran by PCR. Archives of Biological Sciences, 67(1): 83-90.
- Mahmoudvand, P., Varshosaz, M., Nayebzadeh, H., Rocky, A. and Pourmahdi Borujeni, M. (2019). Study the frequency of blood parasites of sheep in Dezful suburb, southwest Iran. Iranian Veterinary Journal, 15(3): 68-78. [In Persian]
- Passos, L.M., Bell-Sakyi, L. and Brown, C.G. (1998). Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Veterinary Parasitology, 76(4): 239-249.
- Rajabi, S., Esmaeilnejad, B. and Tavassoli, M. (2017). A molecular study on Babesia spp. in cattle and ticks in West-Azerbaijan province, Iran. Veterinary Research Forum, 8(4): 299-306.
- Ranjbar Bahadori, SH. and Afshari Moghadam, A. (2009). Study on the prevalence of blood parasites in camels of Zabol in 2008. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 3(2): 503-507. [In Persian]
- Razmi, G.R., Dastjerdi, K., Hossieni, H., Naghibi, A., Barati, F. and Aslani, M.R. (2006). An epidemiological study on Anaplasma infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad suburb, Khorasan province, Iran. Annals of the New York Academy of Sciences, 1078(1): 479-481.
- Shayan, P. and Rahbari, S. (2005). Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. on stained blood smear using PCR. Parasitology Research, 97(4): 281-286.
- Silva, M.G., Henriques, G., Sánchez, C., Marques, P.X., Suarez, C.E. and Oliva, A. (2009). First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from central and southern

regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Veterinary Parasitology, 166(1-2): 66-72.

- Terkawi, M.A., Huyen, N.X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., *et al*. (2011). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Veterinary Parasitology, 178(3-4): 201-207.
- Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Ikonomopoulos, 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. Veterinary Parasitology, 135(2): 99-104.
- Wagner, G.G., Holman, P. and Waghela, S. (2002). Babesiosis and heartwater: threats without boundaries. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 18(3): 417-430.
- Yakhchali, M., Rostami, A. and Esmaelzadeh, M. (2011). Diversity and seasonal distribution of ixodid ticks in the natural habitat of domestic ruminants in north and south of Iran. Revue de Médecine Vétérinaire, 162(5): 229-235.
- Yeruham, I., Hadani, A. and Galker, F. (1998). Some epizootiological and clinical aspects of ovine Babesiosis caused by *Babesia ovis*: a review. Veterinary Parasitology, 74(2-4): 153-163.
- Ziapour, S.P., Esfandiari, B. and Youssefi, M.R. (2011). Study of the prevalence of Babesiosis in domesticated animals with suspected signs in Mazandaran province, north of Iran, during 2008. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(6): 712-714.