# بررسی مولکولی آلودگی گوسفند و بز به گونه های بابزیا در استان سیستان و بلوچستان

روح ا... حسن پور دهنوی[۱]، مریم گنجعلی[۱*]، فریبرز شریعتی شریفی[۱]

## چکیده

در ایران بابزیا یکی از مهمترین تک یاخته های خونی منتقله توسط کنه ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است. بیماری بابزیوز به وسیله گونه های مختلف جنس بابزیا ایجاد می شود که میزبان های مهره دار گوناگون شامل حیوانات اهلی، وحشی و انسان را آلوده می نماید. بابزیا موتازی و بابزیا اویس به عنوان گونه های بیماریزا و شایع درگوسفندان و بزها در ایران شناخته شده اند وگاهی عفونت مضاعف هردوی آنها در یک میزبان گزارش شده است. در ایران بابزیوز هرساله در فصول گرم سال بخصوص اواخر بهار سبب بروز تلفات در گوسفندان می گردد. از آنجایی که بابزیوز در دام ها باعث بروز زیان های اقتصادی به صنعت دامپروری کشور می شود، این پژوهش با هدف شناسایی مولکولی گونه های بابزیا در جمعیت گوسفند و بز استان سیستان و بلوچستان انجام شد. بدین منظور نمونه های خون دامهای مشکوک (گوسفند و بز) در شهرستان های زاهدان، میرجاوه، خاش، سراوان و ایرانشهر همراه با کنه های سطح بدن دام اخذ گردید.از ۱۰۰ نمونه خون جمع آوری شده با استفاده از روش PCR، ۲ مورد بابزیا و ۳٤ مورد تیلریا تشخیص داده شد، همچنین ۱مورد آلودگی همزمان بابزیا و تیلریا (در مجموع ۳موردمثبت بابزیا و ۳۵ مورد مثبت تیلریا) را نشان داد و با روش Semi nested PCR فقط گونه بابزیا اویس شناسایی گردید و با استفاده از کلید های معتبر تشخیصی کنه های هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم، هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم، رپی سفالوس سانگوئینوس و رپی سفالوس تورانیکوس از سطح بدن دامهای آلوده جداسازی و شناسایی شدند.

***واژگان کلیدی:*** *بابزیا ،PCR، سیستان و بلوچستان*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٦/۷

## مقدمه

بابزیوز گوسفندی یکی از مهمترین بیماری های خونی منتقله از راه کنه در نشخوارکنندگان کوچک مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان می باشد و با واگیری و مرگ و میر بالا در دام های اهلی سالیانه خسارات اقتصادی زیادی در ایران ایجاد می کند (۱). عوامل بابزیوز گوسفندی در ایران *بابزیا اویس، بابزیا موتازی* و *بابزیا کراسا* می باشند (۲).

۱. گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل شناسی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه زابل (m_g2507@yahoo.com)

بابزیا موتازی و بابزیا اویس به عنوان گونه های بیماری زا و شایع در گوسفندان و بزان ایران شناخته شده اند وگاهی عفونت مضاعف هردوی آنها در یک میزبان گزارش شده است (۳). بیماری حاصل از عفونت تک‌یاخته بابزیا و تیلریا در دام‌های اهلی شیوع نسبتا بالایی در ایران دارد. از آن جایی که ایران در نگهداری و پرورش دام سابقه طولانی دارد و مراکز پرورش دام به صورت سنتی عمل می کنند و هنوز هم علاوه بر روش صنعتی ،روش سنتی نیز مورد استفاده قرار می گیرد و نیز با توجه به این مطلب که در مراکز سنتی پرورش دام نسبت به مراکز صنعتی در خصوص مبارزه با کنه های سخت ناقل توجه کمتری صورت می پذیرد از این رو، انتظار می رود در مناطقی که پرورش و نگهداری به صورت سنتی انجام می شود عفونت بابزیا بیشتر مشاهده شود(۳،٤). در استان سیستان بلوچستان به دلیل شرایط آب و هوایی گرم و مناسب جهت فعالیت و تکثیر کنه های ناقل بیماری در بیشتر فصول سال، بیماریهای مذکور باعث خسارات زیادی به اقتصاد و تولید در منطقه گردیده است.

روش های مولکولی از اختصاصی ترین و دقیق ترین روش های تشخیص بابزیا می باشند. با استفاده از این روش شناسایی عفونت های توام، موارد پارازیتمی کم انگل، شناسایی دقیق گونه ها، تفکیک گونه های کوچک بابزیا از تیلریا در گاو وگوسفند، شناسایی دام های بدون علامت(حامل) و در نهایت درمان به موقع و صحیح دام ها امکان پذیر خواهد شد. تشخیص دقیق همراه با حساسیت فوق العاده در شناسایی حاملین فاقد نشانه‌های مشخص

بیماری، قطعا از ابزارهای مهم بررسی‌های اپیدمیولوژیک در مناطق اندمیک می‌باشد (۵). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روش nested PCR Semi که روش حساس و اختصاصی برای تشخیص گونه های مختلف بابزیا است، وضعیت آلودگی با گونه های مختلف بابزیای گوسفندی در استان سیستان و بلوچستان مشخص گردد که نتیجه آن در بکارگیری روش های درمانی بیماری و برنامه های مناسب کنترلی موثر خواهد بود.

## مواد و روش کار

در این پژوهش در طی بهار و تابستان سال۱۳۹٦ تعداد ۱۰۰ راس گوسفند و بز (با علایم تب، رنگ پریدگی مخاطات و زردی)در مناطق مختلف استان شهرستان های زاهدان، میرجاوه، ایرانشهر، سراوان و خاش انتخاب و معاینه شدند و از ورید وداج آنها نمونه خون گرفته شد و در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد(EDTA) ریخته شد، در مرحله بعد گوسفندان از لحاظ آلودگی به کنه بررسی شدند و کنه ها که اغلب متصل به گوش و اطراف سر، ناحیه زیر دم و اطراف مقعد و نیز اطراف پستان در دام ماده و اسکروتوم دردام نر بود جدا گردید. انگلهای خارجی جدا شده از هر دام به صورت مجزا به لوله های ونوجکت برچسب دار حاوی الکل ۷۰ درصد وگلیسیرین منتقل شد. نمونه خون جداسازی شده جهت استخراج DNA با استفاده از کیت DNA) MBST extraction kit, MBST, Iran) بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده قرار گرفت.

### واکنشPCR

جهت بررسی حضور پیروپلاسم ها در نمونه های اخذ شده واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ناحیه متغیر ژن 18ssrRNA با توالی (P1):5'-CACAGGGAGGTAGTGACAAG-3' و (p2): 5'-AAGAATTTCACCTATGACAG-3' انجام شد (٦،۷ ) .در این پژوهش از یک جفت پرایمر جهت انجام واکنش PCR بر روی ژن 18S rRNA که بصورت مشترک در این ژن بابزیا و تیلریا موجود می باشد، استفاده گردید. از آنجایی که قسمت مورد تکثیر در *بابزیا* نسبت به قسمت مشابه در *تیلریا* از تعداد کمتری نوکلئوتید برخوردار است محصولات PCR از این ژن با پرایمرهای تعریف شده در این دو پیروپلاسم متفاوت می‌باشند. محصول PCR در همه گونه‌های *بابزیا* بین ٤۰۰– ۳۸۹ جفت باز می‌باشد، در حالی که در *تیلریا* سنگین‌تر و ٤۲٦ جفت باز است. بنابراین می توان با این تک جفت پرایمر به صورت همزمان بین بابزیا و تیلریا تمایز داد. برای انجام واکنش PCR: ٤ µl از DNAاستخراج شده ،۲۵µl Taq DNA polymerase ×۲- Master Mix (شرکت پیشگام– ایران)، pmol ۳۰از هرپرایمر و آب مقطر استریل 15µl در حجم نهایی ۵۰ µlانجام شد. واکنش PCR در دستگاه اتوماتیک ترموسایکلر با استفاده از برنامه زیر انجام شد: ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جهت جداسازی کامل دو رشته DNA ، سپس ۳۸ سیکل به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه (جهت جداسازی ثانویهDNA) ، ٤۵ ثانیه در ۵٦ درجه سانتیگراد (مرحله اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در الگو ) ، ٤۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد (جهت انجام واکنش همانندسازی) و یک سیکل به‌مدت۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت همانندسازی کاملDNA صورت پذیرفت.

### Semi-Nested PCR

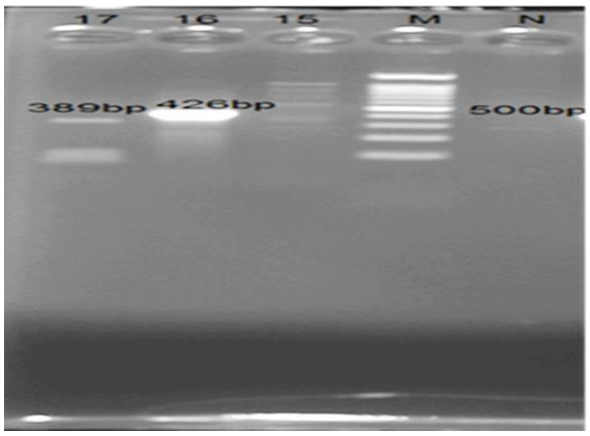
به منظور شناسایی گونه های *بابزیا*، محصول تمام نمونه های خونی که نتیجه PCR آنها با استفاده از پرایمر های اختصاصی P1 و P2 منشعب از ژن کد کننده 18S rRNA مثبت شده بود (با مقادیر ذکر شده در واکنش PCR) با پرایمر های داخلی اختصاصی منشعب از ژن کد کننده 18S rRNA تحت آزمایش Semi-Nested PCR قرار گرفتند.

در مرحله دوم تکثیر، پرایمرهای P2 و P3 برای شناسایی *بابزیا اویس* و P2 و P4 برای شناسایی *بابزیا موتازی* استفاده شدند. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *بابزیا اویس* P2: 5´AAGAATTTCACCTATGACAG 3´ و پرایمر P3: 5´GTC TGC GCG CGG CCT TTG CG3´ و پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی *بابزیا موتازی* عبارتند از: P2: 5´AAGAATTTCACCTATGACAG 3´و 5´ CGC GAT 3´ P4: TCC GTT ATT GGA G3´.

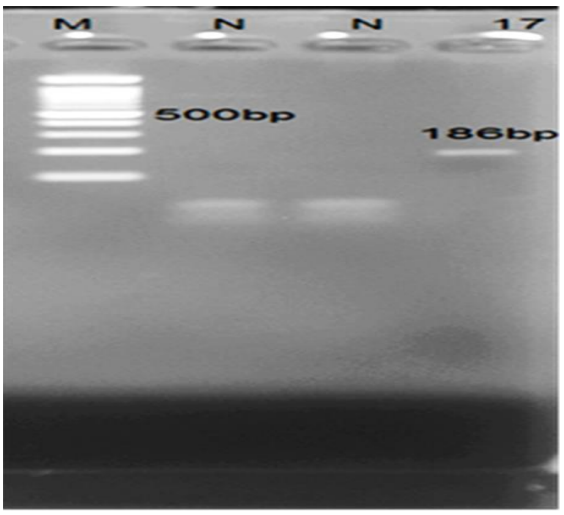
واکنش **Semi-Nested PCR** در دستگاه اتوماتیک ترموسایکلر با استفاده از برنامه زیر انجام شد: ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد ، سپس ۳۵سیکل به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ ثانیه ، ٦۰ ثانیه در ٥٦ درجه سانتیگراد (مرحله اتصال پرایمرها به قسمت مکمل در الگو ) ، ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد (جهت انجام واکنش همانندسازی) و یک سیکل به‌مدت۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت همانندسازی کامل DNA صورت پذیرفت. پس از انجام الکتروفورز ، اندازه محصول Semi-Nested PCR، *بابزیا اویس* ۱۸٦ جفت باز و *بابزیا موتازی* ۲۰۵ جفت باز می باشد. به منظور شناسایی کنه ها، هر کنه در آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل، با آب استریل شسته شده و روی کاغذهای فیلتر استریل خشک شد و از طریق کلید تشخیص Walker تعیین جنس و گونه گردید (۸)..

## نتایج

با استفاده از روش PCR بر روی DNA استخراج شده از ۱۰۰نمونه خون اخذ شده از گوسفندان و بزها و الکتروفورز محصول PCR برروی ژل آگارز، باند نمونه‌های مثبت *بابزیا* در محدوده bp ۳۸۹و باند نمونه های مثبت *تیلریا* در محدوده ٤۳۰bp قرار گرفت (تصویر شماره ۱). تعداد ۲ نمونه آلوده به بابزیا، ۳٤ نمونه آلوده به تیلریا، ۱ نمونه آلودگی توام تیلریا و بابزیا(در مجموع ۳موردمثبت بابزیا و ۳۵ مورد مثبت تیلریا) و بقیه نمونه ها (٦۲ نمونه) منفی بودند.




نگاره ۱- شکل باندها مربوط به نمونه‌های خون مثبت *تیلریا* و *بابزیا* (N معرف کنترل منفی و M نشان‌دهنده مارکر. وزن نمونه های *تیلریا*(شماره ۱٦) حدود ٤۲٦bp و وزن نمونه های مثبت *بابزیا* (شماره ۱۷) حدود ۳۸۹bpمی باشد.




نگاره ۲- باند های حاصل از الکتروفورز محصول Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی P2 و P3 بر روی ژل آگارز ۲ درصد (N معرف کنترل منفی، M نشان‌دهنده مارکر و وزن باند شماره ۱۷حدود ۱۸٦bpمی باشد).

ارزیابی محصول PCR مرحله اول با آزمون Semi-Nested PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی *بابزیا اویس*(P2 و

P3) و *بابزیا موتازی*(P2 وP4) *نشان* داد که نمونه های آلوده به *بابزیا*، *بابزیا اویس* می باشند و بابزیا موتازی مشاهده نگردید (تصویر شماره ۲). در این پژوهش با توجه به اینکه در نمونه های خون مربوط به ۳ راس دام وجود *بابزیا اویس* تایید شد کنه های جمع آوری شده مربوط به نمونه های مثبت، با استفاده از *استریومیکروسکوپ* و با استفاده از کلیدهای تشخیصی معتبر، *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم*، *هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم*، *ریپی سفالوس سانگوئینوس* و *ریپی سفالوس تورانیکوس* از دامهای آلوده جداسازی و شناسایی شدند.

## بحث

در بررسی پیش‌رو ۱۰۰ نمونه خون از گوسفند و بز در شهرستان های زاهدان، میرجاوه، خاش، سراوان و ایرانشهر همراه با کنه های سطح بدن دام اخذ گردید. از ۱۰۰ نمونه خون جمع آوری شده با استفاده از روش PCR، ۲ مورد *بابزیا* و ۳٤ مورد *تیلریا* تشخیص داده شد، همچنین ۱مورد آلودگی همزمان بابزیا و *تیلریا*(در مجموع ۳موردمثبت بابزیا و ۳۵ مورد مثبت تیلریا) را نشان داد و با روش Semi nested PCR فقط گونه *بابزیا اویس* شناسایی گردید و با استفاده از کلید های معتبر تشخیصی کنه های *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم*، *هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم*، *ریپی سفالوس سانگوئینوس* و *ریپی سفالوس تورانیکوس* از دامهای آلوده جداسازی و شناسایی شدند.

بر اساس مطالعات انجام شده آزمایش میکروسکوپی حساسیت کمی برای تفریق بابزیا و تیلریا در نشخوارکنندگان کوچک دارد و به خصوص *زمانی* که پارازیتمی کم است و روشهای دقیق تر و حساس تر مثل PCR برای تشخیص این انگلها مورد نیاز است. (۱۲،٦). در مطالعات انجام شده در سایر مناطق استان سیستان و بلوچستان از جمله بررسی مولکولی جهت شناسایی ناقلین و گونه های *تیلریا* در زابل (استان سیستان و بلوچستان) در سال ۲۰۱۵، آنالیز محصول PCR نشان داد که از ۸۰ نمونه خون اخذ شده از گوسفندان، تعداد ۵۰ مورد (٦۲/۵ ٪) آلوده به انگل *تیلریا* بودند ، ارزیابی محصول PCR مرحله اول با آزمونNested PCR نشان داد که عفونت با *تیلریا اویس* و *تیلریا لستوکاردی* به ترتیب ٦۷/٤۵و۳۲/۵۵موارد را شامل می شد (۹). شریفی و همکاران نیز در زابل در استان سیستان و بلوچستان شیوع بابزیوز را ۳/۷۵ ٪ و تیلریوز را ٦٦/۲۵٪ گزارش نمودند. در این مطالعه نیز در بررسی مولکولی شیوع *بابزیوز* از *تیلریوز* پایین‌تر و مشابه یافته‌های ما می‌باشد(۱۰). در مناطق مختلف ایران *بابزیا اویس* عامل اصلی ایجادکننده بابزیوز گوسفندی به وسیله روش های مولکولی شناخته شده است و کنه ریپی سفالوس بورسا به عنوان ناقل اصلی *بابزیا موتازی* و *بابزیا اویس* در نظر گرفته شده است (۱۱).

متولی حقی و همکاران درشناسایی مولکولی گونه های *بابزیای* گوسفندی درشمال ایران (استان مازندران و گلستان) به روش Semi-nested PCR، در ۵ درصد نمونه های خون *بابزیا اویس و بابزیا موتازی* و در ۲٤ درصد نمونه ها *تیلریا* را شناسایی کردند. در این مطالعه همچنین دو نمونه مثبت عفونت توام با *تیلریا* رانشان دادند که در مورد شیوع پایین *بابزیوز* نسبت به *تیلریوز* و همچنین مشاهده آلودگی توام *تیلریا* و *بابزیا*، با مطالعه ما همخوانی دارد (۱۱). طی تحقیقی که صادقی دهکردی و همکاران در گوسفندان در مناطق مختلف ایران (خوزستان و مرکزی، ایلام، آذربایجان و خراسان شمالی) انجام دادند و به بررسی مورفومتریک و بیولوژی مولکولی *بابزیا* پرداختند، طبق مشاهدات میکروسکوپی ۲٤/٦۸٪ *بابزیا*، ۲٦٪ *تیلریا* و آلودگی توام ٤٪ گزارش کردند و با روش PCR نیز کار را تکرار کردند که نتایج به این صورت بود: ۵/۵۸٪ *بابزیا*، ۵۳٪ *تیلریا* و آلودگی توام ۱۱/۷٪ بود. در این مطالعه نیز در بررسی مولکولی شیوع *بابزیوز* از *تیلریوز* پایین‌تر و مشابه یافته‌های

ما می‌باشد (۱). در سایر کشورها در مطالعه اکتاس و همکاران در سال ۲۰۰۵برای تشخیص عفونت بابزیا در گوسفند و بز با استفاده از روش PCR در ترکیه فقط *بابزیا اویس* شناسایی گردید(۱۲). سید ابادی و همکاران در بررسی بابزیوز در شمال خراسان آلودگی به *بابزیا اویس* را ٦/٦ درصد گزارش کردند و کنه های *ریپی سفالوس سانگوینوس* و *هیالوما مارژیناتوم* را به عنوان ناقل معرفی کردند(۱۳). در مطالعه ای که بکلو و همکاران بر روی کنه های دام های اهلی در شمال ایران انجام دادند با روش Nested PCR *بابزیا اویس* و کنه های ناقل را *ریپی سفالوس سانگوئینوس* و *Hyalomma Scupense* شناسایی کردند (١٤). محمد عبدی گودرزی در شناسایی عفونت طبیعی کنه های حامل گونه های مختلف *تیلریا و بابزیا* در ۳ ناحیه ی آنزئوتیک ایران کنه ی *ریپی سفالوس تورانیکوس* را به عنوان ناقل *بابزیا اویس* در استان فارس معرفی نمود (۱۵). شیوع پایین بابزیا در ۵/۸ درصد گوسفندان ایران (۱)، ۵درصد گوسفندان شمال ایران (۱۱) و ٦/٦ گوسفندان شمال خراسان و در سایر کشورها مثل ترکیه (١٦) و آلمان (۱۷) گزارش شده است. در مطالعه حاضر بابزیا موتازی شناسایی نشد در حالیکه در مطالعه رزمی و همکاران در خراسان با بررسی پارامتر های مورفولوژیک (۱۸) و در بعضی از مطالعات مولکولی بابزیا موتازی گزارش گردید (۱۹،۲۰،۱) براساس نتایج به دست آمده به نظر می رسد بابزیوز شیوع نسبتا کمی در جمعیت گوسفند و بز استان سیستان و بلوچستان دارد و عامل اغلب موارد بابزیوز در منطقه بابزیا اویس است و کنه های *هیالوما آناتولیکوم آناتولیکوم، هیالوما آسیاتیکوم آسیاتیکوم، ریپی سفالوس سانگوئینوس و ریپی سفالوس تورانیکوس* از دامهای آلوده جداسازی و شناسایی شدند که ممکن است ناقل این تک یاخته باشند که این مساله باید در اجرای اقدامات لازم برای مبارزه با آنها مدنظر باشد.

این مطالعه در واقع یک اقدام اولیه برای تشخیص شیوع بابزیوز در منطقه است همچنین اولین گزارش مولکولی گوسفندان منطقه به گونه *بابزیا اویس* می باشد و با توجه مشکلات موجود در تشخیص بر اساس مورفولوژی، لازم است که در مطالعات آینده از روش مولکولی جهت شناسایی گونه های *تیلریا* و *بابزیا* و تشخیص قطعی نقش ناقلین در انتقال این تک یاخته ها در منطقه استفاده شود.

## فهرست منابع


1- Dehkordi ZS, Zakeri S, Nabian S, Bahonar A, Ghasemi F, Noorollahi F, et al. Molecular and biomorphometrical identification of ovine babesiosis in Iran. Iranian journal of parasitology. 2010;5(4):21.

2- Tavassoli M, Haji-Ghahremani S. Identification of Babesia speices and tick infestation in sheep in Ardabil. J faculty Vet Med Univ Tehran. 1993;59(1):10-2.

3- Hashemi-Fesharki R. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parassitologia. 1997;39(2):115-7.

4- Kalani H, Fakhar M, Pagheh A. An overview on present situation babesiosis and theileriosis and their distribution of ticks in Iran. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2012;5(4):59-71.

5- Motevalli Haghi SM, Fakhar M, Sharif M, Keyghobadi M. An overview on different diagnostic methods for babesiosis. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2014;23(109):283-95.

6- Schnittger L, Yin H, Qi B, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, et al. Simultaneous detection and differentiation of Theileria and Babesia parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitology research. 2004;92(3):189-96.

7- Shayan P, Rahbari S. Differentiation of sheep Theileria spp. and Babesia spp. by polymerase chain reaction. 2007;62(2):15-20

8- Walker AR. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species: Edinburgh Bioscience Reports publishing ; 2003.
9- Zarei F, Ganjali M, Nabavi R. Identification of Theileria Species in Sheep and Vector Ticks Using PCR Method in Zabol, Eastern Iran. Journal of arthropod-borne diseases. 2019;13(1):76.
10- Sharifi N, Ganjali M, Nabavi R, Saadati D. A study on prevalence and identification of ovine Theileria and Babesia infection in Zabol using PCR method. Journal of parasitic diseases. 2016;40(4):1535-9.
11- Motavali HSM, Fakhar M, Sharif M, Paghe A, Sharbatkhori M, Tavakoli R, et al. Molecular identification of ovine Babesia spp. in north of Iran. 2013;1(1):35-39.
12- Aktaş M, Altay K, Dumanlı N. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats. Veterinary parasitology. 2005;133(4):277-81.
13- Seidabadi M, Razmi G, Naghibi A. Molecular detection of Babesia spp in sheep and vector ticks in North Khorasan province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2014;8(1):35-9.
14- Bekloo AJ, Bakhshi H, Soufizadeh A, Sedaghat MM, Bekloo RJ, Ramzgouyan MR, et al. Ticks circulate Anaplasma, Ehrlichia, Babesia and Theileria parasites in North of Iran. Veterinary parasitology. 2017;248:21-4.
15- Abdigoudarzi M. Detection of naturally infected vector ticks (Acari: Ixodidae) by different species of Babesia and Theileria agents from three different enzootic parts of Iran. Journal of arthropod-borne diseases. 2013;7(2):164.
16- Altay K, Dumanli N, Aktas M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of Theileria and Babesia species infecting small ruminants. Veterinary Parasitology. 2007;147(1-2):161-5.
17- Theodoropoulos G, Gazouli M, Ikonomopoulos J, Kantzoura V, Kominakis A. Determination of prevalence and risk factors of infection with Babesia in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. Veterinary parasitology. 2006;135(2):99-104.
18- Razmi G, Naghibi A, Aslani M, Dastjerdi K, Hossieni H. An epidemiological study on Babesia infection in small ruminants in Mashhad suburb, Khorasan province, Iran. Small Ruminant Research. 2003;50(1-2):39-44.
19- Ranjbar-Bahadori S, Eckert B, Omidian Z, Shirazi NS, Shayan P. Babesia ovis as the main causative agent of sheep babesiosis in Iran. Parasitology research. 2012;110(4):1531-6.
20- Shayan P, Hooshmand E, Nabian S, Rahbari S. Biometrical and genetical characterization of large Babesia ovis in Iran. Parasitology research. 2008;103(1):217-21.