REVIEW ARTICLE

An Overview on Different Diagnostic Methods for Babesiosis

Seyed Moosa Motevalli Haghi[1],
Mahdi Fakhar[2],
Mehdi Sharif[3],
Masoud Keighobadi[4]

[1] MSc Student in Parasitolgy, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Toxoplasmosis Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD Student in Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 25, 2013 ; Accepted December 25, 2013)

Abstract

Babesiosis is one of the most important parasitic infectious diseases in livestock industry throughout the world. Studies with various diagnosis methods have been done on this disease, nevertheless the current status of using the diagnosis methods with high specificity and sensitivity is not well defined. Hence, this narrative review investigated the published articles on the status of Babesiosis and its diagnostic methods in Iran and the world. The data were collected from available scientific databases including Google scholar, Pub med, Web of science, Scopus, Springer, and Scientific Information Database (SID). We found many studies with different diagnostic methods for detection of genus and species of Babesia spp. In recent years, using specific diagnostic methods has increased, although traditional methods (peripheral blood smear) with low sensitivity are still applied in some parts of the world and also in Iran. Our investigations show that researchers frequently use molecular and serological methods to increase the accuracy of diagnosis.

Keywords: Babesiosis, diagnosis, peripheral blood smear, molecular method, serological method

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(109): 283-295 (Persian).

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـــزشـــکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۹ بهمن سال ۱۳۹۲ (۲۹۵-۲۸۳)

مروری بر روش های مختلف تشخیصی بیماری بابزیوز

سیدموسی متولی حقی[۱]
مهدی فخار[۲]
مهدی شریف[۳]
مسعود کیقبادی[۴]

چکیده

بابزیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی انگلی در صنعت دام‌پروری اکثر نقاط دنیا است. علی‌رغم مطالعاتی که با استفاده از روش‌های تشخیصی گوناگون روی این بیماری انجام شده است وضعیت کنونی استفاده از روش‌های تشخیصی با ویژگی و حساسیت بالا به‌طور دقیق روشن نیست. لذا هدف از این مطالعه بررسی مقالات منتشر شده در ایران و جهان و مرور روش‌های تشخیصی بابزیوز است. مطالعه حاضر از نوع مروری غیر نظام مند است. جامعه مورد مطالعه از پایگاه‌های اطلاعاتی علمی قابل دسترس نظیر Google scholar, Pub med, Web of Science, Scopus, Springer, SID و غیره گردآوری شد. بررسی مطالعات انجام شده در ایران و جهان نشان داد در نقاط مختلف جهان از روش‌های تشخیصی متفاوت جهت شناسایی جنس و گونه‌های بابزیا استفاده شده است. هرچند در ایران و برخی از نقاط جهان با وجود روش‌های نوین تشخیصی، هنوز روش‌های سنتی مانند اسمیر خون محیطی با حساسیت تشخیصی پایین استفاده می‌شوند اما روند استفاده از این قبیل روش‌ها در سال‌های اخیر سیرنزولی داشته است واستفاده از روش‌های مولکولی و سرولوژی رو به افزایش است. اغلب محققین جهت افزایش دقت و قدرت تشخیص از دو روش اختصاصی (مولکولی و سرولوژی) بیش‌تر بهره گرفته‌اند.

واژه های کلیدی: بابزیوز، تشخیص، روش مولکولی، روش سرولوژی، اسمیرخون محیطی

مقدمه

بابزیوز بیماری انگلی ژئونوز است که با نام های پیروپلاسموز (piroplasmosis)، تب کنه (Tick fever)، تب قرمز (Red fever) ،تب طحال (spleen fever)، تب تکزاس (texas fever) و تریستزا (tristeza) نیز شناخته می شود(۱). بیماری در ایران به اسامی ساریلق، گان ایشماق و قیزما در آذربایجان، هل گران و خونه میز درکردستان، چرخون درسمنان، بوسفار درخوزستان، زالاش جیگانره جیک باد وجیکبزه درگیلان و مازندران و در سایر مناطق، زردی، یرقان و کنه زدگی نامیده می‌شود(۲). عامل بیماری بابزیوز تک یاخته داخل سلولی اجباری جنس بابزیا است. انگل بابزیا در شاخه اپی کمپلکس‌ها، راسته پیروپلاسمیدا (Piroplasmida) و جزو خانواده بابزیده (Babesidae) طبقه‌بندی می‌شود(۳). تاکنون بیش از ۱۱۰ گونه بابزیا شناسایی شده است. بیماری‌های بابزیوز که توسط گونه‌های متفاوت تک یاخته جنس بابزیا ایجاد می سود در گروه

مولف مسئول: مهدی فخار– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادانگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴.دانشجوی دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۱۲/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۲/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۱۰/۴

وسیعی از مهره داران به خصوص نشخوارکنندگان اعم از اهلی و وحشی، تک سمی‌ها، سگ سانان، گربه سانان، جوندگان، پرندگان(۴) و حتی انسان در بسیاری از نقاط دنیا گسترش دارد. اولین مورد بابزیوز در گاوهای تب‌دار توسط ویکتور بابز (Victor Babes) در سال ۱۸۸۸ گزارش شد(۳) و هم‌چنین اولین مورد آلودگی انسان در سال ۱۹۵۷ در یوگسلاوی تشخیص داده شد. تا سال ۱۹۹۵ بیش از ۴۰۰ مورد انسانی از آمریکا و سایر نقاط جهان گزارش شد که بیش‌ترین گزارشات انسانی مربوط به بابزیا میکروتی (microti) است و سایر گونه‌های زئونوز که انسان را آلوده می‌کنند شامل بابزیا اکوئی (equi)، بابزیا دایورجنس (divergens)، بابزیا اوویس (ovis)، بابزیادونکانی (duncani)، بابزیا بوویس (bovis) و بابزیا کابالی (cabali) است(۷،۵). این انگل از لحاظ مرفولوژی دارای تمام خصوصیات شاخه اپی کمپلکس بوده و از نظر اندازه (بیومتری) و مورفولوژی (تصویر شماره ۱) اشکال گوناگون دارد. اشکال میکروسکوپی متفاوت آن شامل صلیبی(تتراد)، گلابی، بیضی، آمیبی، دوتایی و غیره است و از نظر اندازه، گونه‌های به ابعاد ۲/۵-۱ میکرون، جزء گونه‌های کوچک و ۵-۲/۵ جزء گونه‌های بزرگ تقسیم‌بندی می‌شوند(۸). انتقال این انگل توسط کنه‌های سخت از خانواده Ixodidae صورت می‌پذیرد که هفت جنس از آن‌ها به نام‌های Haemaphysalis، Dermacentor، Hyalomma mblyomma، Boophilus، Rhipicephalus، و Ixodes ناقل بابزیا هستند که هر هفت جنس در ایران وجود دارند(۵،۲). مرحله جنسی انگل در بدن کنه و مرحله غیر جنسی در بدن میزبان مهره دار طی می‌شود. علایم بیماری در میزبان مهره دار شامل: افزایش ناگهانی درجه حرارت (برخی مواقع حتی به ۴۲ درجه سانتی‌گراد نیز هم می‌رسد) بی‌قراری، ضعف و لاغری و کاهش اشتها، کم خونی شدید و لیز شدن گلبول‌های قرمز و وجود هموگلوبین در ادرار است(۳). در مجموع با توجه به وجود اطلاعات پراکنده در زمینه کاربرد روش‌های مختلف تشخیص بیماری بابزیوز، بررسی حاضر با هدف مروری بر روش‌های تشخیصی رایج و نوین این بیماری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مروری غیر نظام مند (narrative review) است. جامعه مورد مطالعه از پایگاه‌های اطلاعاتی در دسترس نظیر Google scholar، pub med، web of science، Scopus، Springer، SID، (Scientific Information Database)، Iranmedex و Magiran و کنگره‌های انگل‌شناسی و دامپزشکی گردآوری شدند. کلید واژه‌های جستجو شده شامل: بابزیوز، گونه‌های بابزیا، تشخیص، PCR، سرولوژی، شیوع (که این کلمات به تنهایی و یا به صورت ترکیبی مورد جست و جو قرار گرفتند) است.

یافته ها

وضعیت بابزیوز در ایران

بررسی‌های انجام شده روی مقالات به دست آمده از پایگاه‌های علمی معتبر در دسترس و هم‌چنین سایر منابع علمی نشان داد که بابزیا اویس توسط دلپی (۱۹۳۶) اولین بار در ایران، در خون گوسفند و بز شناسایی شد(۱۴). سال ۱۹۸۱ گونه‌ای از انگل بابزیا به نام بابزیا کراسا (crassa) (که اغلب به اشکال چهارتایی دیده می شود) در خون گوسفند اهلی توسط هاشمی فشارکی و اویلینبرگ (Uilenberg) شناسایی و توصیف شد. این گونه از بابزیا بیماری‌زایی خفیفی داشته و جزء بابزیاهای بزرگ تقسیم می‌شود(۱۵). از آن زبان تاکنون گونه مذکور در ایران گزارش نشده است.

از آن جایی‌که ایران در نگهداری و پرورش دام سابقه طولانی دارد و مراکز پرورش دام به صورت سنتی عمل می‌کردند و هنوز هم علاوه بر روش صنعتی، روش سنتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد و نیز با در نظر گرفتن این مطلب که در مراکز سنتی پرورش دام

نسبت به مراکز صنعتی در خصوص مبارزه با کنه‌های سخت ناقل توجه کم تری صورت می‌پذیرد از این‌رو، انتظار می‌رود در مناطقی که پرورش و نگهداری به صورت سنتی انجام می‌شود عفونت بابزیا بیش‌تر مشاهده شود(۱۶،۵). بررسی‌های اپیدمیولوژی در خصوص شناسایی کنه‌های ناقل بابزیا و پراکندگی آن‌ها در ایران نشان می‌دهد فراوانی نسبی ناقلین بابزیا در ایران به ترتیب مربوط به گونه‌های مختلف کنه‌های رپیسفالوس (ناقل مناسب برای بابزیا گوسفند)، هیالوما، همافیزالیس، ایکسودس و بوفیلوس (ناقل مناسب برای بابزیا گاو) است(۲۲-۱۶).

بررسی مقالات محققین ایرانی در نواحی مختلف کشور بیان گر آن است که بیماری بابزیوز در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) شیوع بیش‌تری دارد و گونه غالب، بابزیا اوویس است. در حالی که عفونت بابزیا در گاو (با توجه به فراوانی کم‌تر و محدودیت ناقلین اصلی آن در کشور) شیوع کم‌تری دارد. در مجموع گاوهای ایران بیش‌تر به بیماری تیلریوز مبتلا می‌شوند. به‌طور کلی درخصوص بیماری بابزیوز در گاو مطالعات اندکی انجام شده است. ضمن این‌که در این مطالعات اندک شناسایی بر اساس بررسی اسمیر خون محیطی بوده است که دقیق نیست. (به دلیل شباهت زیاد برخی از گونه‌های تیلریا با گونه‌های کوچک بابزیا در گاو) و بر اساس مطالعات مذکور، گونه غالب در گاو بابزیا بایژمینا است(۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۵، ۱۹، ۲۰). اغلب مطالعات اپیدمیولوژی در ایران بر پایه خصوصیات مورفولوژی انگل بابزیا با بررسی میکروسکوپی گسترش خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا است که در نواحی مختلف جغرافیایی کشور انجام شده است(۲۶- ۲۳). هم‌چنین مطالعات محدود سرواپیدمیولوژی(۲۸، ۲۹) تنها روی گوسفندان نواحی مختلف ایران انجام شده است که در یکی از این مطالعات، میزان شیوع سرمی عفونت بابزیا در گوسفندان نواحی چهارگانه جغرافیایی ایران ۳۶ درصد گزارش شده است. در این بررسی بیش‌ترین شیوع مربوط به نواحی کوهستانی شامل استان‌های مجاور رشته کوه‌های البرز و زاگرس و کم‌ترین شیوع مربوط به نواحی کویری بود(۲۸). در سال‌های اخیر، از روش‌های مولکولی به منظور شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های بابزیا (اغلب شامل گونه‌های بابزیا در گوسفند و بز و به صورت موردی در خصوص بابزیا گاو) در ایران استفاده شده است(۱۰،۱۲،۱۴،۱۶،۲۲،۲۹،۳۴-۳۰) که این روند رو به افزایش است(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: روش های مختلف تشخیصی بیماری بابزیوز در نواحی مختلف ایران

سال	محقق	روش تشخیصی	ناحیه جغرافیایی مورد مطالعه
۱۳۶۱	دلپی	PBS[1]	موسسه رازی
۱۳۵۷	رفیعی	PBS	نواحی مختلف ایران
۱۳۶۱	هاشمی فشارکی	PBS	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۱	لطف الله –نوری	PBS	خوزستان
۱۳۷۱	عبدالهی	PBS	ارومیه
۱۳۷۵	حاج حسینلو	PBS	ارومیه
۱۳۷۵	اصلانی	PBS	شیراز
۱۳۷۶	غیاثی	PBS	ارومیه
۱۳۷۷	توسلی –رهبری	Serology(IFA)	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۷	هاشمی فشارکی	PBS	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۷	فتحی وند	PBS	مشهد
۱۳۷۷	هاشمی فشارکی	PBS	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۸	شایان	PBS و PCR	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۸	توسلی –رهبری	Serology(IFA)	نواحی مختلف ایران
۱۳۷۹	فتحی وند خلیلی	PBS	مشهد
۱۳۷۹	سیفی و همکاران	PBS	مشهد
۱۳۸۱	رزمی و همکاران	PBS	مشهد
۱۳۸۳	توسلی –حاجی قهرمانی	PBS	اردبیل
۱۳۸۲	عزیزی و همکاران	PBS	اصفهان(لنجان)
۱۳۸۳	رزمی و همکاران	PBS	مشهد
۱۳۸۴	نعمان و همکادان	PBS	اصفهان (عشایر)
۱۳۸۴	فلاح و همکاران	PBS	تبریز (کشتارگاه)
۱۳۸۴	اشرفی	PBS	نواحی مختلف ایران
۱۳۸۵	شایان و همکاران	PBS –PCR	نواحی مختلف ایران
۱۳۸۵	هاشم زاده	Serology(ELISA)	خوزستان
۱۳۸۵	رسولی و همکاران	PBS	ارومیه
۱۳۸۶	گنجعلی	PCR	مشهد
۱۳۸۷	فتاح پور وهمکاران	PBS	استان تهران (ساوجبلاغ)
۱۳۸۷	شایان –رهبری	PCR	نواحی مختلف ایران
۱۳۸۷	نعمان	PBS	اصفهان
۱۳۸۸	شایان و همکاران	RFLP, PCR	نواحی مختلف ایران
۱۳۸۹	حاجی حسنی و همکاران	PBS	کردستان
۱۳۹۰	دهکردی و همکاران	PCR -Morphometry	نواحی مختلف ایران
۱۳۹۰	ضیاء پور و همکاران	PBS	مازندران
۱۳۹۰	فخار و همکاران	PBS	کردستان
۱۳۹۰	حاجی حسنی و همکاران	PBS	کردستان
۱۳۹۱	رنجبر و همکاران	PCR	گرمسار
۱۳۹۱	رزمی و همکاران	PCR	خراسان
۱۳۹۲	متولی حقی و همکاران	PCR	مازندران و گلستان

1. PBS: Peripheral blood smear

وضعیت بابزیوز در جهان

بر اساس مقالات منتشر شده بیش‌تر موارد انسانی بیماری به‌صورت اسپورادیک و از آمریکای شمالی (اغلب بابزیا میکروتی) و اروپا، جنوب شرق آسیا شامل ژاپن و تایوان (بیش‌تر بابزیا دایورجنس) گزارش شده است. بررسی بیماری بابزیوز در جهان با روش‌های متفاوت انجام شده است که نوع این بررسی‌ها به اهداف تحقیق وابسته بوده است. به‌طور مثال برخی از تحقیقات برای بررسی شیوع بابزیوز بر اساس روش گسترش ضخیم و نازک طراحی شده است(۳۸- ۳۵). هم‌چنین بررسی‌هایی جهت تمایز جنس بابزیا از تیلریا و تعیین گونه صورت گرفته که روش‌های مورد استفاده در این تحقیقات مولکولی بوده است(۴۵- ۳۹). مطالعاتی نیز با استفاده از روش‌های اختصاصی سرولوژی انجام شده است(۵۰- ۴۶). هم‌چنین برخی از محققین دو روش تشخیصی اختصاصی را به‌طور هم‌زمان به‌کار برده‌اند(۳۸،۵۱-۳۵) استفاده از دو روش تشخیصی به‌صورت توام دقت و حساسیت را بالا برده و کارآیی آن را افزایش می‌دهد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: روش های مختلف تشخیصی بیماری بابزیوز در درنواحی مختلف جهان

سال	محقق	روش تشخیصی	ناحیه جغرافیایی مورد مطالعه
۱۹۶۸	Barnett et al	PBS	لندن
۱۹۸۱	Applewhait	Serology	گویانا
۲۰۰۰	Sparagano et al	PCR	ایتالیا
۲۰۰۱	Almeria et al	PCR , PBS	مینورکا
۲۰۰۲	Ahmed et al	PCR , PBS	چین
۲۰۰۲	Caccio et al	PCR , PBS	اروپا
۲۰۰۳	Jefferies et al	PCR	استرالیا
۲۰۰۴	Inokuma et al	PCR	ژاپن
۲۰۰۵	Aktas et al	PCR	ترکیه
۲۰۰۵	Thoodoropoulosetal	PCR	یونان
۲۰۰۵	Oyamada et al	PCR	سودان
۲۰۰۵	Passos et al	PCR	برزیل
۲۰۰۶	Allsopp et al	PCR	نیویورک
۲۰۰۶	Carcia et al	PCR	اسپانیا
۲۰۰۶	Goff et al	PCR	کلین
۲۰۰۷	Altay et al	PCR	ترکیه
۲۰۰۷	Aktas et al	PCR	ترکیه
۲۰۰۸	Altay et al	PBS, PCR	ترکیه
۲۰۰۸	Mjhirbi et al	PCR	تونس
۲۰۰۸	Altay et al	PCR	ترکیه
۲۰۰۹	Adhem et al	PCR	مصر
۲۰۰۹	Silva et al	Serology	پرتغال
۲۰۱۰	Silva et al	Serology	پرتغال
۲۰۱۱	Terkawi et al	Serology, PCR	تایلند
۲۰۱۱	Terkawi et al	Serology	آفریقای جنوبی
۲۰۱۲	Sivakumar et al	PCR	مغولستان
۲۰۱۲	Githaka et al	PCR , PBS	کنیا

روش های مختلف تشخیصی

الف: روش های تشخیص بالینی

۱- در حیوان زنده ومشکوک به بابزیوز

بابزیوز در نشخوار کنندگان به‌خصوص در گوسفند و بز به صورت عفونت‌های فوق حاد، مزمن و بدون علایم کلینکی ظاهر می‌شود. مهم‌ترین علایم مشخصه بیماری افزایش ناگهانی درجه حرارت دام (بعضی مواقع حتی به ۴۲ درجه سانتی‌گراد نیز می‌رسد) بی‌قراری، ضعف، سستی، عدم تمایل حیوان به خوردن غذا، کم خونی شدید، لیز شدن گلبول‌های قرمز وآزاد شدن هموگلوبین، مشاهده هموگلوبین در ادرار (Hemoglobinuria) است. از طرفی غشاء مخاطی رنگ پریده شده و زردی گسترش می‌یابد. حیوان بیمار ممکن است اسهال یا یبوست داشته باشد و مدفوع حیوان خشک، زرد و گاهی همراه با رگه‌های خون است که ممکن است این علایم در مراحل اولیه بیماری و در عفونت‌های فوق حاد دیده نشود. در اثر کاهش آب بدن چشم‌ها در حدقه فرو می‌رود و نیز لرزش عضلانی، لاغری مفرط و دندان قروچه هم می‌تواند از علایم دیگر ابتلاء به بابزیوز باشند. در دام‌های آلوده به بابزیا بویس یا در سگ‌های آلوده به بابزیا کانیس، بابزیوز با آسیب‌های مغزی همراه بوده که علایم آن تلو تلوخوردن، عدم تعادل در راه رفتن، حالت جنون و اغماء است و معمولاً چند ساعت قبل از مرگ درجه حرارت بدن به پایین‌تر از حد طبیعی رسیده و سپس حیوان تلف می‌شود. در مرحله حاد بیماری این احتمال وجود دارد که با دفع کامل تک یاخته از خون در فاصله ۴۸-۲۴ ساعت، بازگشت اشتها و طبیعی شدن درجه حرارت بدن، بهبودی دام مشاهده شود. از طرفی در عفونت‌های نه چندان حاد ممکن است در طی یک تا

سه هفته تک یاخته در خون دیده شود و ممکن است افزایش درجه حرارت نیز وجود داشته باشد و درجه حرارت به ۴۰ درجه سانتی‌گراد هم برسد که در چنین مواردی بی‌اشتهایی و افسردگی هم دیده می‌شود. هموگلوبینوری معمولاً دیده نمی‌شود ولی زردی خفیف مشاهده می‌شود و حتی ممکن است حیوان نیازی به درمان نداشته و بدون تجویز دارو بهبود یابد.

۲- حیوان تلف شده و مشکوک به بابزیوز

علایم بالینی بابزیوز در دام تلف شده شامل ادم و پرخونی اعضای شکمی، بزرگی طحال همراه با پولپ تیره و نرم، کبد بزرگ، رنگ پریده و زرد و کیسه صفرا بزرگ شده با مایع تیره رنگ است در مغز، ریه‌ها، عضله قلب و غدد لنفاوی حالت پرخونی دیده می‌شود. امکان خونریزی در اپی کارد و اندوکارد و هم‌چنین ترمبوز (لخته خون) در عروق ریوی، کبد و کلیه ها وجود دارد.

ب: روش های پارازیتولوژی

۱- تهیه گسترش ضخیم و نازک خون محیطی

بررسی میکروسکوپی گسترش‌های تهیه شده از خون محیطی حیوانات زنده یا تلف شده مشکوک به بابزیوزتوسط افراد با تجربه (با توجه به این‌که علایم بالینی عفونت بابزیا به‌طور نسبی شبیه تیلریا است) انجام می‌شود. بررسی‌های میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک تهیه شده از رگ‌های موضعی و عمقی دام زنده و هم‌چنین گسترش‌های تهیه شده از خون قلب، مغز استخوان، کبد و طحال دام‌های تلف شده رایج‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیص بابزیوز است. اما این روش چندان قابل اعتماد نیست و نیاز به تجربه و مهارت زیادی دارد به‌ویژه در مورد گونه‌های کوچک بابزیا (گونه‌های ۲/۵-۱ میکرونی) مانند بابزیا بوویس و اویس. اشکال گرد، بیضوی و گلابی گونه‌های بابزیا به صورت انفرادی یا دوتایی در درون گلبول‌های قرمز دام مبتلا جای دارند و در دستگاه گردش خون به حالت آزاد دیده نمی‌شوند که باید در ابتدا در گسترش ضخیم و سپس در گسترش نازک این تک یاخته بررسی شود. اگرچه در مراحل مزمن بیماری و در موارد پارازیتمی کم، این انگل توسط روش اسمیر خونی مشاهده نمی‌شود ولی تا چندین سال مطالعه روی بابزیوز تنها با همین روش انجام می‌شد که این روش حساسیت و ویژگی پایینی دارد.

۲- اسمیر مغزی

اسمیر مغزی در حیوان تلف شده معمولاً در بابزیا بوویس به همراه علایم کلینیکی می‌تواند به تشخیص کمک کند. در این روش مقدار کمی از بخش خاکستری مغز یا قشر مغز روی یک لام گسترش تهیه شده و سپس فیکس شده و رنگ‌آمیزی صورت می‌پذیرد. تشخیص بر اساس مشاهده گلبول‌های قرمز آلوده به انگل موجود درعروق موئینه مغز است. اگر چه بررسی گلبول‌های عروق موئینه مغزی بسیار مفید است اما تهیه اسمیر از سایر اندام‌ها مانند کلیه و کبد می‌تواند به تشخیص کمک کنند.

۳- تهیه اسمیر از همولنف

انتقال انگل بابزیا توسط کنه‌های سخت در هنگام خونخواری از مخازن دام آلوده صورت می‌پذیرد. تشخیص در کنه ناقل به کمک مرحله کینت در همولنف کنه انجام می‌شود. بدین منظور یکی از پاهای کنه را جدا و با یک قطره از همولنف خارج شده از بدن کنه روی یک لام گسترش تهیه می‌شویم. پس از خشک شدن در هوا و فیکس کردن با متانول، با گیمسا رنگ‌آمیزی می‌شود تشخیص بر اساس مشاهده کینت صورت می‌گیرد. این فرم از انگل، کرمی شکل و به اندازه تقریبی ۹- ۱۶- ۱۴/۳ میکرون طول و ۳/۴- ۲/۱۸ میکرون عرض می‌باشد. البته در این روش افتراق گونه‌ها بسیار مشکل است.

۴- تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی

با تزریق خون حیوانات مشکوک به گوساله ها و بره های سالم (فاقد طحال) و پیگیری علایم بیماری و با

مشاهده تک یاخته در گسترش‌های تهیه شده ازاین حیوانات بیماری تشخیص داده می‌شود.

۵- کشت خارج سلولی بابزیا (In-vitro): مهم‌ترین (MASP) گونه‌های قابل کشت و نگهداری بابزیا شامل بابزیا بویس، بابزیا بایژمینا، بابزیا اویس، بابزیا کابالی، و بابزیا اکویی است. حیوانات حساس آزمایشگاهی گوساله‌ها و بره‌های سالم بدون طحال هستند روش کار به این ترتیب است که خون حیوان مشکوک از طریق وریدهای محیطی به حیوان حساس تزریق شده وسپس علایم بالینی پیگیری و گسترش‌های ضخیم و نازک جهت شناسایی انگل تهیه می‌شود. لذا کشت می‌تواند به عنوان یک ابزار بسیار حساس برای تشخیص حیوانات حامل انگل به کار رود. از معایب این تکنیک می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: نیاز به وسایل کشت بافتی گران‌قیمت، پرسنل ماهر، دستیابی به تعداد مناسب انگل نیاز به حداقل یک ماه زمان در اغلب محیط‌های کشت عمومی حاوی گلبول‌های قرمز خون دفیبرینه و شسته شده دارد. جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها از آنتی بیوتیک‌های Garamaycin و Amphotericin B استفاده می‌شود. ذکر این نکته ضروری است که برخی محققین استفاده از سرم جنین گاو را به عنوان مهار کننده رشد بابزیا توصیه می کنند که این مسأله مورد قبول سایر محققین نیست(۵۷- ۵۳). به طور مثال کشت بابزیا بوویس به این شیوه انجام می‌گیرد که HEPES-buffered ۵۰ درصد و سرم تازه گاوی ۵۰ درصد در PH ۷ ترکیب شده و سوسپانسیون ۲۰تا۳۰ درصدی گلبول‌های قرمز به آن اضافه می‌شود. این محیط را باید در دمای ۳۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با دی اکسید کربن ۵ درصد و فشار هوا ۹۵ درصد نگهداری کرد. در ضمن هر روز باید پاساژ داده شود. بدین ترتیب کشت انبوه بابزیا تولید خواهد شد(۵۸).

در حال حاضر سایر محیط‌های کشت مورد استفاده از جمله RPMI 1640,M199 و NCTC-135 (PH بین ۶/۷ و ۷/۳) جهت رشد شناسایی شدند. علاوه بر این برخی از محققین استفاده از تکنیک (MASP) Microaerophilous Stationary layer را در کشت انبوه انگل بابزیا مفید می‌دانند که این روش آسانتر و مناسب‌تر از سایر روش‌های ذکر شده است(۵۵،۵۹).

محیط‌های کشت مناسب برای گونه‌های مختلف بابزیا به شرح زیر می‌باشد:

۱- محیط کشت مناسب جهت بابزیا دایورژنس (زئونز)، HEPES buffered RPMI 1640 و سرم انسانی (۱۰ درصد) همراه با خون کامل (۵ درصد)(۶۰).

۲- محیط کشت مناسب جهت بابزیا کابالی: HEPES-buffered HL-1 medium (۸۰ درصد) به همراه Glutamine، Hypoxanthine و Horse serum (۲۰ درصد) (۶۱).

۳- محیط کشت مناسب جهت بابزیا اکوئی: HL-1, Albumax1, HB 101, Glutamine و سرم جنین گوساله(۶۲).

۴- محیط کشت مناسب برای بابزیا میکروتی و بابزیا رودهائینی: RPMI 1640، سرم جنین گاوی، CO2 و O2 (۶۳).

۵- محیط کشت مناسب جهت بابزیا کانیس: Canine serum , RPMI 1640 medium و carbon dioxide Sub culture یا HL-1 medium, Dog serum Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) و Fetal bovine serum

۶- محیط کشت مناسب جهت بابزیا Odocoileus virginianus: Medium 199, Deer serum (۲۰ درصد) و Adult bovine serum (۳۰ درصد).

Babesia - like isolate: جداسازی شبه بابزیاها از خون انسان به نام WA-1 در ایالت واشنگتن و کالیفرنیا گزارش شده است(۶۰،۶۶-۶۴).

۷- محیط کشت مناسب جهت WA-1 human: Glutamine ,O2 ,CO2 ,N2,TES buffered medium 199 و Fetal calf serum (۴۰ درصد) (۶۹- ۶۵).

ج- روش های ایمونولوژیک

به طور کلی برای ارزیابی پاسخ‌های های ایمنی پس از عفونت بابزیا روش‌های متعددی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بررسی‌های اپیدمیولوژی به علت مشکل بودن شناسایی مستقیم تک یاخته در گسترش‌های خون و در برخی موارد به‌علت پایین بودن میزان پارازیتمی، روش‌های سرولوژی نقش مؤثرتری دارند. از طرفی با استفاده از روش‌های سرولوژی می‌توان اثر درمانی داروهای ضد بابزیوز رادر عفونت‌های حاد بیماری بررسی نمود. علاوه بر این به بررسی پاسخ‌های هموورال در حیوانات واکسینه شده روش بسیار مناسبی برای ارزیابی ایمنی دام و اثر بخشی ایمنوژن است. هر نوع روش سرمی براساس میزان حساسیت و اختصاصی بودن، سادگی انجام دارای مزایا و معایبی است. ارزش تشخیصی روش‌های سرولوژی برای شناسایی غیر مستقیم تک یاخته با محدودیت‌های زیر همراه است.

۱- عدم امکان استفاده در مرحله کمون بیماری

۲- بالا بودن تیتر آنتی‌بادی پس از بهبودی و دارو درمانی به مدت طولانی و تفسیر آزمایش بر اساس آن

۳- مشکل تفسیر تیتر مثبت پایین در تشخیص غیر مستقیم بابزیوز و نامشخص بودن مرحله دقیق بیماری

اگرچه تیتر بالای پاسخ ایمنی می‌تواند دلیل مشخص و قطعی بیماری باشد ولی پایین بودن تیتر پادتن‌های هموورال و یا منفی بودن پاسخ ایمنی نمی‌تواند معرف عدم عفونت بابزیایی باشد.

انواع روش‌های شناسایی آنتی‌ژن و آنتی بادی در تشخیص بابزیوز عبارتند از:

۱- آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect Haemgglutination test)

۲- آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون (Agglutination test Latex)

۳- آزمایش سرم یا اسلاید آگلوتیناسیون (slide agglutination or test Serum)

۴- آزمایش رادیوایمنواسی (Immunoassay Radio test)

۵- آزمایش ایمنوفلورسانت غیر مستقیم (Indirect Fluorescent Antibody test)

۶- آزمایش الیزا (Immuno-sorbent assay Enzyme Linked)

۷- آزمایش ثبوت عناصر مکمل (Complement fixing test)

آزمایش‌های فوق در تشخیص غیر مستقیم بابزیوز مورد استفاده قرار می‌گیرند اما با توجه به توصیه‌های محققین، انجام آزمایش‌های الیزا و IFA در تشخیص بابزیوز مناسب‌تر هستند(۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۲، ۷۰). با توجه به تفاسیر متعدد و متفاوت در ارزیابی سررولوژی، گروهی از محققین توصیه می‌نمایند برای اطمینان از تشخیص غیر مستقیم بابزیوز در صورت امکان از دو روش سرولوژی استفاده شود. به‌طور کلی انجام آزمایش‌های سرولوژی در موارد تشخیص گروهی حیوانات حامل گونه‌های متفاوت بابزیا و مطالعات سرواپیدمیولوژی در مناطق آندمیک و غیرآندمیک پیشنهاد می‌شود.

د: روش‌های ملکولی: شامل PCR Reverse, line blot hybridization (RLB) Real Time PCR (RT- PCR) Loop Mediated isothermal است.

استفاده از PCR برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ جهت شناسایی انگل بابزیا برای گونه‌های بوویس، بایزمینا و میکروتی به‌طور هم‌زمان گزارش شد(۷۱). روش‌های ملکولی، اختصاصی‌ترین، مطمئن‌ترین و دقیق‌ترین روش تشخیصی بابزیا است. با استفاده از این روش‌ها، شناسایی عفونت‌های توام، موارد پارازیتمی کم انگل، شناسایی دقیق گونه‌ها، تفکیک گونه‌های کوچک بابزیا از تیلریا در گاو و گوسفند، شناسایی دام‌های بدون علامت و در نهایت درمان به موقع و صحیح دام امکان پذیر خواهد شد.

برای انجام روش مولکولی و استخراج DNA می‌توان از نمونه‌های خونی متعددی از قبیل خون حاوی ضد انعقاد EDTA، خون فیکس شده در اتانول، خون خشک شده، بافی کوت، گسترش‌های خونی

رنگ‌آمیزی شده و رنگ‌آمیزی نشده استفاده نمود. نتایج مطالعات متعدد نشان دادند که شناسایی بابزیا در مقدار کم‌تر از ده عدد در میکرولیتر خون حیوان آلوده با روش PCR امکان پذیر است(۱۳، ۲۰، ۳۵، ۳۸ و ۷۱).

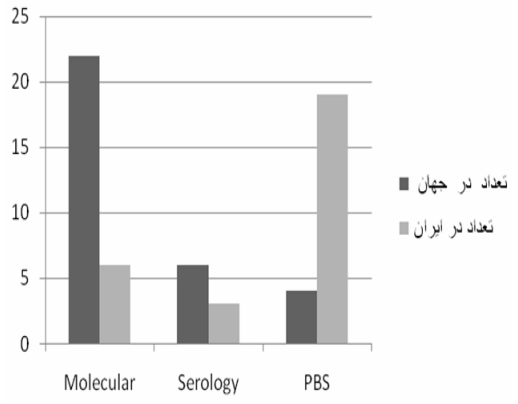
به طور معمول از روش‌های ملکولی مانند PCR، Semi Nested PCR و RFLP برای جداسازی جنس و گونه‌های بابزیا استفاده می‌شود. هنگامی که هدف شناسایی چندین گونه یا استرین در نمونه خون یا بافت (از جمله در موارد عفونت توام گونه‌های بابزیا) باشد، بهترین روش تشخیصی روش RLB است از این‌رو، این روش ارزشمند، اغلب در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۷۰).

Real Time-PCR: در این روش توالی DNA موجود در نمونه شناسایی وهم‌چنین تعداد کپی‌های آن تعیین می‌شود. این عمل توسط مارکرهای فلورسنت در طول عمل صورت می‌گیرد. این روش کمی PCR به منظور تعیین بار انگلی و شدت آلودگی مورد استفاده قرار می گیرد و در موارد پیگیری درمان بسیار مفید است(۷۰).

LAMP: یک روش تشخیصی است که در آن تحت شرایط دمایی خاص (تک دمایی) DNA با حساسیت و سرعت بالا بدون نیاز به دستگاه ترمو سایکلر تکثیر می‌یابد. در این روش اغلب چهار پرایمر اختصاصی به منظور تکثیر شش توالی مختلف DNA هدف طراحی می‌شود. بنابراین این روش بسیار اختصاصی است. هم‌چنین حساسیت این روش به‌طور محسوسی بالا است و در این روش مقادیر فراوانی از DNA تولید می‌شود که می‌توان به‌طور مستقیم با روش‌های مختلفی از جمله رنگ سنجی و سنجش کدورت آن‌را مشاهده و برای آنالیز مورد استفاده قرار داد. از این روش برای شناسایی انگل در خون محیطی و نیز تعیین گونه‌های آن می‌توان استفاده نمود.

کیت های تشخیصی: تست ایمونو کروماتوگرافی (ImmunoChromatographic Test) آزمونی سریع است که جهت شناسایی آنتی‌بادی علیه آنتی ژن اختصاصی انگل بابزیا روی مقدار کمی از سرم حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد و به‌صورت کیت‌های تجارتی در دسترس است. در این کیت آنتی‌ژن‌های نو ترکیب روی نوارهای نیترو سلولزی پوشانده شده‌اند. استفاده از کیت‌های تشخیصی، سریع (۱۵ دقیقه) و مقرون به صرفه بوده و در شرایط فیلد به‌راحتی قابل انجام است. از جمله کیت‌های تشخیصی سریع می توان به کیت‌های Pet NAD (PetNAD Canine Babesiosis Detection Kit) و کیت‌های تشخیصی و تفکیک بابزیا از تیلریا و بابزیا از پلاسمودیوم و هم‌چنین Rapid Immunochromatographic Test (BoiICT) اشاره کرد(۷۱،۷۲).

در مجموع، بررسی مطالعات انجام شده در ۲۰ سال اخیر در ایران و جهان بیانگر آن است که اکثر روش‌های تشخیصی در ایران روش هایی میکروسکوپی بوده است، با توجه به دقت و حساسیت بالای روش‌های مولکولی و سرولوژی و نیز میزان بالای استفاده از این روش‌ها در سایرکشورهای جهان، استفاده از روش‌های ملکولی و سرولوژی در سال‌های اخیر در ایران روند رو به رشدی داشته است (نمودار شماره ۱). افزایش میزان استفاده از روش‌های نوین تشخیصی منجر به افزایش صحت و دقت در تشخیص گونه‌های بابزیا می‌شود.



نمودار شماره ۱: مطالعات انجام شده برای تشخیص بابزیوز در کشور ایران و جهان به تفکیک روش تشخیصی طی ۲۰ سال اخیر

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مطالعات انجام شده در نواحی مختلف ایران نشان دهنده شیوع نسبتاً بالای بابزیوز در دام‌های اهلی ایران به ویژه در استان‌های نواحی غربی و شمال شرق ایران می‌باشد. به طور کلی این مطالعات حاکی از آن است که بیماری بابزیوز در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) شایع‌تر بوده و در گاو شیوع کم‌تری دارد. بیماری تیلریوز در این حیوانات شایع‌تر است که سالانه خسارات زیادی به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند(۵،۱۰،۱۵،۲۷). بابزیا اوویس و بابزیا موتاسی به عنوان گونه‌های بیماری زا و شایع در گوسفندان و بزها و بابزیا بایزمینا و بوویس (موارد گزارش شده اندک) در گاوهای ایران شناخته شده‌اند و گاهی عفونت مضاعف هر دو آن‌ها در یک میزبان نیز گزارش شده است(۵،۱۵،۱۶،۱۹،۲۷). بررسی‌های انجام شده در ایران نشان می‌دهد که اغلب مطالعات روی بیماری بابزیوز در گوسفندان و تیلریوز در گاوها انجام گرفته است. با توجه به شباهت تابلوی بالینی دو بیماری بابزیوز و تیلریوز و هم‌چنین شباهت اشکال مرفولوژی انگل‌های بابزیا و تیلریا(۹)، شناسایی این تک یاخته خونی با استفاده از سایر روش‌های تشخیصی از جمله روش‌های مولکولی و سرولوژی امکان پذیر است(۵،۱۰،۱۱). تاکنون اغلب گزارشات شیوع بابزیوز در ایران و جهان، بر پایه روش‌های پارازیتولوژی (برسی میکروسکوپی) ارائه شده اما این روش حساسیت کم‌تری نسبت به روش‌های ملکولی دارد(۷،۱۲). بنابراین تشخیص بیماری به یک رو اختصاصی با قدرت تشخیصی بالا نیاز دارد از جمله این روش‌ها تست‌های سرولوژیکی است(۱۰). به تازگی روش‌های ملکولی برای تشخیص و تعیین گونه بابزیا مورد استفاده قرار گرفته است(۷، ۱۱، ۱۳). بنابراین توصیه می‌شود در ایران نیز مانند سایر کشورهای آندمیک به منظور شناسایی عفونت‌های توام، پارازیتمی کم انگل، شناسایی دقیق گونه‌ها و تفکیک گونه‌های کوچک بابزیا از تیلریا در گاو و گوسفند و شناسایی دام‌های بدون علامت از روش PCR استفاده شود.

References

1. Gharavi MJ. Clinical Parasitology. 3th ed. Tehran: Teimorzahed; 2003.
2. Tavassoli M. Veterinary Protozoology. 1st ed. Uromieh: University Publisher Center; 2006. p. 186-211.
3. Fischer M. Manual of Tropical Veterinary Parasitology. CAB International, London. 2008; 2: 16-20.
4. Kreier JP, Baker JR. Parasitic Protozoa. 1st ed. Winchester: Allen and Unwin, Inc; 1987.
5. Kalani H, Fakhar M, Pagheh A. An overview on present situation of babesiosis and theileriosis and their distribution of ticks in Iran. Iranian J Med Microbiol 2010; 5(7): 59-71.
6. Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thoford J, Wainwright K, Eberhard M, et al. Description of Babesia duncani n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. Int J Parasitol 2006; 36(7): 779-789.
7. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. Babesia: A world emerging. Infect Genetic Evolu 2012; 12(8): 1788-1809.
8. Uilenberg G. Babesia-A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 3-10.
9. Noaman V, Jahangirnejad AA, Nabinejad A. A study on prevalence and identification of Babesia spp. in immigrant sheep and goats and nomadic people of Isfahan Province. Pajouhesh Sazandegi 2004; 67: 35-41.
10. Rafiyi A. Veterinary protozoology and comparative. Tehran: Publications of the

Scientific Research Council Secretariat. Ministry of Sciences and Higher Education 1978.

11. Sadeghi Dehkordi Z, Zakeri S, Nabian S, Bahonar A, Ghasemi F, Noorollahi F, Rahbari S. Molecular and biomorphometrical identification of ovine Babesiosis in Iran. Iranian J Parasitol 2010; 5(4): 21-30.
12. Fakhar M, Hajihasani A, Maroufi SH, Alizadeh H, Shirzad H, Piri F, Pagheh A. An epidemiological survey on bovine and ovine babesiosis in Kurdistan Province, western Iran. Trop Anim Health Prod 2012; 44(2): 319-322.
13. Motavalli Haghi SM, Fakhar M, Sharif M, Paghe AS, Sharbatkhori M, Tavakoli R, et al. Molecular identification of ovine *Babesia* spp. in north of Iran. Res Mol Med 2013; 1(1): 36-40.
14. Delpy RLP. Agents en Iran dans le sang des animaux domestiques. Bull Path Exot 1936; 29: 157-161.
15. Hashemi-Fesharaki R, Uilenberg G. Babesia crassa n.sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. Vet Quarterly 1981; 3(1): 1-8.
16. Hashemi-Fesharaki R. Tick-born disease of sheep and goats and their related vectors in Iran. Parasitologia 1997; 39: 115-117.
17. Razmi GhR, Nouroozi E, Transovarial Transmission of Babesia ovis by Rhipicephalus sanguineus and Hyalomma marginatum. Iranian J Parasitol 2010; 5(3): 35-39.
18. Razmi GR, Najarnejad V, Rashtibaf M. Determination the frequency of Ixodid ticks on the sheep in Khorasan Razavi province, Iran. Arch Razi Institute 2011; 66(2): 129-132.
19. Mazlum Z. Tick species of Iran, its distribution, host and seasonal activity. J Vet Fac Uni Tehran 2007; 62(1): 1-28.
20. Razmi G, Pourhosseini M, Yaghfouri S, Rashidi A, Seidabadi M. Molecular detection of Theileria spp. and Babesia spp. in sheep and ixodid ticks from the northeast of Iran. J Parasitol 2013; 99(1): 77-81.
21. Razmi GR, Naghibi A, Aslani MR, Dastjerdi K, Hossieni H. An epidemiological study on Babesia infection in small ruminants in Mashhad suburb, Khorasan Province, Iran. Small Rumin Res 2003; 50(1): 39-44.
22. Shayan P, Hooshmand E, Rahbari S, Nabian S. Determination of Rhipicephalus spp. as vectors for Babesia ovis in Iran.Parasitol Res 2003; 101(4): 1029-1033.
23. Razmi GR, Naghibi A, Aslani MR, Fathivand M, Dastjerdi K. An epidemiological study on ovine babesiosis in the Mashhad suburb area, province of Khorasan, Iran. Vet Parasitol 2002; 108(2): 109-115.
24. Ziapour SP, Esfandiari B, Youssefi MR. Study of the prevalence of Babesiosis in domesticated animals with suspectedsigns in Mazandaran Province, north of Iran, during 2008. J Animal Vet Adv 2011; 10(6): 712-714.
25. Hosseni HS. Parasitic infections of domesticated animals. Tehran: Tehran University Press; 2003.
26. Azizi H, Pourjafar M, Ayati Sajzeyi H. Prevalence of Sheep Babesiosis during Spring and Summer 2003 in Lenjan- Isfahan. J Sch Vet Med 2005; 9(11): 67-75.
27. Tavassoli M, Haji-Ghahremani SH. Identification of Babesia speices and tick infestation in sheep in Ardabil. J faculty Vet Med Univ Tehran 1993; 59(1): 10-12.
28. Tavasoli M, Rahbari S. Seroepidemiological survey of Babesia ovis in sheep at different geographical regions of Iran. J faculty Vet Med Univ Tehran 1998; 53: 55-59.

29. Hashemzadeh farhang H, Nabavi L, Seyfiabad shapouri MR, Rahbari S, Azizi F. Development of an ELISA technique for the detection of Babesia ovis and serological survey of the parasite in Khouzestan province, southern Iran. Iranian J Vet Res 2006; 7(2): 53-58.
30. Tavassoli M, Tabatabaei M, Mohammadi M, Esmaeilnejad B, Mohamadpour H. PCR-based detection of Babesia spp. infection in collected ticks from cattle in West and North-West of Iran. J Arthropod Borne Dis 2013; 7(2): 132-138.
31. Shayan P, Rahbari S. Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. On stained blood smear using PCR. Parasitol Res 2005; 97(4): 281-286.
32. Razmi GR, Khodaverdi M. Diagnosis of *Theileria annulata* in cattle with subclinical or clinical symptoms by polymerase chain reaction (PCR). 15th Iranian Veterinary Congress 2008; Tehran, Iran.
33. Heidarpour Bami M, Khazraiinia P, Haddadzadeh HR, Kazemi B. Identification of Theileria species in sheep in the eastern half of Iran using nested PCR-RFLP and microscopic techniques. Iranian J Vet Res 2010; 11(3): 262-266.
34. Noaman V. A molecular study on Theileria and Babesia in cattle from Isfahan province, Central Iran, J Parasit Dis 2013. (Published Online).
35. Razmi G, Pourhosseini M, Yaghfouri S, Rashidi A, Seidabadi M. Molecular detection of Theileria spp. and Babesia spp. in sheep and ixodid ticks from the northeast of Iran. J Parasitol 2013; 99(1): 77-81.
36. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuño A, Estrada-Peña A, Gutiérrez JF. Bovine piroplasma in Minorca (Balearic Island, Spine): a comparison of PCRbased and light microscopy detection. Vet Parasitol 2001; 99(3): 249-259.
37. Ahmed J, Yin H, Schnittger L, Jongejan F. Ticks and tick-borne diseases in Asia with special emphasis on China. Parasitol Res 2002; 88(13 Suppl 1): S51-55.
38. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158 (4): 295-301.
39. Caccio SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric RR, et al. Molecular characterization of Babesia canis canis and Babesia canis vogeli from naturally infected European dogs. Vet Parasitol 2002; 106(4): 285 - 292.
40. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215: 403-410.
41. Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP. Detection of Babesia bovis carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. J Clin Microbiol 1992; 30: 1374-1379.
42. Theodoropoulos G, Gazouli M, Ikonomopoulos JA, Kantzoura V, Kominakis A. Determination of prevalence and risk factors of infection with Babesia in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. Vet Parasitol 2005; 135(2): 99-104.
43. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood. Vet Parasitol 1993; 50: 69-81.
44. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, De Vos AP, Caracappa S, Ongejan F. Integrated

molecular diagnosis of Theileria and Babesia species of cattle in Italy. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 533-539.

45. Oyamada M, Davoust B, Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, et al. Detection of Babesia canis rossi, B. canis vogeli, and Hepatozoon canis in dogs in a village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. Clin Diag Lab Immun 2005; 12(11): 1343-1346.
46. Passos LM, Geiger SM, Ribeiro MF, Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of Babesia vogeli in dogs from Brazil. Vet Parasitol 2005; 127(1): 81-85.
47. Applewhaite LM, Craig TM, Wagner GG. Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. Trop. Anim Health Prod 1981; 13: 13-18.
48. Bose R, Jacobson RH, Gale KR, Waltisbuhl DJ, Wright IG. An improved ELISA for the detection of antibodies against Babesia bovis using either a native or a recombinant B. bovis antigen. Parasitol Res 1990; 76: 648-652.
49. Hauschild S, Shayan P, Schein E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different Babesia canis isolates by serological and immunological investigations. Parasitol Res 1995; 81: 638-642.
50. Silva MG, Henriques G, Snchez C, Marques PX, Suarez CE. First survey for Babesia bovis and Babesia bigemina infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Vet Parasitol 2009; 166(1-2): 66-72.
51. Silva MG, Marques PX, Oliva A. Detection of Babesia and Theileria species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. Vet Parasitol 2010; 174(3-4): 199-205.
52. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, et al. Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet Parasitol 2011; 178(3-4): 201-207.
53. Terkawi MA, Thekisoe OM, Katsande C, Latif AA, Mans BJ, Matthee O, et al. Serological survey of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle in South Africa. Vet Parasitol 2011; 182(2-4): 337-342.
54. Shikano SK, Nakada R, Shimada HT, Ono K. A short term in vitro cultivation of Babesia rodhaini and Babesia microti. J Vet Med Sci 1995; 57: 955-957.
55. Canning EU, Winger CM. Babesiidae. In vitro methods for parasite cultivation. Taylor AER, Baker JR, (ed). New York: Academic Press; 1987; p. 199-229.
56. Levy MG, Ristic M. Cultivation and in vitro studies of Babesia. In vitro cultivation of protozoan parasites. Jensen JB, (ed). Boca Raton, Fla: CRC Press; 1983. p. 221-241.
57. Bautista CR, Kreier JP. The action of macrophages and immune serum on growth of Babesia microti in short-term cultures. Tropenmed Parasitol 1980; 31: 313-324.
58. Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno BM. Continuous in vitro cultivation of Babesia bovis. Am J Vet Res 1980; 41: 1141-1142.
59. Goff WL, Yunker CE. Effects of pH, buffers and medium storage on the growth of Babesia bovis in vitro. Int J Parasitol 1988; 18: 775-778.
60. Gorenflot A, Brasseur P, Precigout E, L'Hostis M, Marchand A, Schrevel J. Cytological and immunological responses to Babesia divergens in different hosts: ox, gerbil, man. Parasitol Res 1991; 77: 3-12.

61. Zweygarth E, Van Niekerk CJ, de Waal DT. Continuous in vitro cultivation of Babesia caballi in serum-free medium. Parasitol Res 1999; 85: 413-416.
62. Holman P, Chieves WM, Frerichs D, Olson G, Wagner G. Babesia equi erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. J Parasitol 1994; 80: 232-236.
63. Shikano S, Nakada R, Hashiguchi T, Shimada T, Ono K. A short term in vitro cultivation of Babesia rodhaini and Babesia microti. J Vet Med Sci 1995; 57:955-957.
64. Quick RE, Herwaldt JW, Thomford ME, Garnett ML, Eberhard M, Wilson DH, et al. Babesiosis in Washington State: a new species of Babesia? Ann Int Med 1993; 119: 284-290.
65. Thomford JW, Conrad SR, Telford IIID, Mathiesen BH, Bowman A, Spielman ML, et al. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. J Infect Dis 1994; 169: 1050-1056.
66. Persing DH, Herwaldt C, Glaser RS, Lane JW, Thomford D, Mathiesen PJ, et al. Infection with a Babesia-like organism in northern California. New Engl J Med 1995; 332: 298-303.
67. Jackson LA, Waldron SJ, Weier HM, Nicoll CL, Cooke BM. Babesia bovis: culture of laboratory-adapted parasite lines and clinical isolates in a chemically defined medium. Exp Parasitol 2001; 99(3): 168-74.
68. Brown CGD. Theileriidae. In vitro methods for parasite cultivation. In Taylor AER, Baker JR, (ed). New York: Academic Press; 1987. p. 230-253.
69. Thomford JW, Conrad PA, Boyce WM, Holman PJ, Jessup DA. Isolation and in vitro cultivation of *Babesia* parasites from free-ranging desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. J Parasitol 1993; 79: 77-84.
70. Mosqueda J, Olvera-Ramírez A, Aguilar-Tipacamú G, Cantó GJ. Current Advances in detection and treatment of Babesiosis. Current Med Chemist 2012; 19(10): 1504-1518.
71. Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, Benitez D, Barba-Carretero JC, Florin-Christensen M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Babesia bovis and B. bigemina. Vet Parasitol 2007; 147(1-2): 16-25.
72. New standard for veterinary Diagnosis. 2012; Available at: http://www.petnad.com/produc ts_ 3.php? prod=14. Accessed May 2, 2013.