DOI: 10.22092/VJ.2018.115622.1366
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

بررسی آلودگی به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی در الاغ‌های استان کردستان

• سیامک کاکه خانی
گـروه انگل شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
• صادق رهبری (نویسنده مسئول)
گـروه انگل شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
•رسول مدنی
بخش پروتئومیکس و بیوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
• سعید بکایی
گروه اپیدمیولوژی و بیماری‌های مشترک- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۵-۰۷-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۵-۱۰-۱۳۹۶

Email: srahbari@ut.ac.ir

چکیده

انگل‌های خونی در تک‌سمی‌ها ایجاد بیماری‌هایی را می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به پیروپلاسموزیس اشاره نمود. پیروپلاسموز در تک‌سمی‌ها بوسیله *Theileria equi* و *Babesia caballi* ایجاد شده و دارای گسترش جهانی می‌باشد و به عنوان یک تهدید جدی برای آن‌ها مطرح می‌باشد. در این مطالعه وقوع آلودگی به تک‌یاخته‌های خونی در جمعیت الاغ های استان کردستان با استفاده از روش‌های مشاهده انگل درگسترش مستقیم و جداسازی مولکولی قطعات DNA ژنوم اختصاصی انگل صورت پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۲۳۳ نمونه خون بصورت تصادفی از الاغ‌های استان کردستان جمع‌آوری شد. در بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا هیچ موردی از تیلریا اکویی و بابزیا کابالی مشاهده نگردید. بررسی مولکولی قطعات DNA ژنوم نمونه‌های خونی با استفاده از پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A نشان داد که علی‌رغم حضور قطعه ۴۰۱ و ۴۳۰ جفت باز مربوط به ژنوم بابزیا و تیلریا بر روی ژل آگارز به عنوان شاهد مثبت، هیچ یک از نمونه‌های تحت مطالعه آلودگی به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی را نشان نداد.

کلمات کلیدی: تیلریا اکویی، بابزیا کابالی، الاغ، استان کردستان، PCR

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 93-98

A survey on the infestation of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Donkeys in Kurdestan Province, Iran

By: By: Kakekhani, S., Department of Parasitology and Mycology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Rahbari, S., (Corresponding Author) Department of Parasitology and Mycology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Madani, R., Proteomics and Biochemistry Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Department of Microbiology, School of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Bokaei, S., Department of Epidemiology & Zoonosis, School of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

Received: 2017-09-27 **Accepted: 2018-01-15**

Email:srahbari@ut.ac.ir

Blood parasites cause the disease in Equine which the most important of them is Piroplasmosis. Equine piroplasmosis is caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, and it has a global expansion which known as an important threat to them. The present study is aimed at detecting piroplasm infection in Donkeys in Kurdestan province, Iran by molecular and microscopic approaches. In this study 233 blood samples, were randomly collected from Donkeys of Kurdestan province. During microscopic examination of Giemsa-stained blood smears, infection with *Theileria equi* and *Babesia caballi* was not observed. The Tbs-S/Tbs-A primer set was used for PCR amplification of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. However , the result indicated that despite the presence of 401 and 430 bp related to the *Theileria equi* and *Babesia caballi* genome on the agarose gel as a positive control, none of them was positive for *Theileria equi* and *Babesia caballi* on a agarose gel electrophoresis.

Keyword: *Theileria equi, Babesia cabali*, Donkey, Kurdestan province, PCR

مقدمه

تک‌سمی‌ها از جمله حیواناتی هستند که در تاریخ زندگی انسان‌ها به عنوان مهم‌ترین و اصلی‌ترین دام جهت سواری، بارکشی، شخم‌زدن زمین‌های کشاورزی و حمل و نقل کالاها در خدمت جوامع بشری بوده‌اند. اگرچه امروزه با پیشرفت و توسعه در بخش حمل و نقل و مکانیزه شدن بخش کشاورزی اما در مناطق کوهستانی و صعب‌العبور نیاز به تک‌سمی‌ها جهت حمل و نقل و انتقال کالاها و سایر مایحتاج روزمره احساس می‌شود. پیروپلاسموزیس یک بیماری تک‌یاخته‌ای با ناقل کنه در اسب، قاطر، الاغ و گورخر می‌باشد. پیروپلاسموز در تک‌سمی‌ها بوسیله بابزیا کابالی و تیلریا اکویی ایجاد شده و دارای گسترش جهانی است و به عنوان یک تهدید جدی برای اسب‌ها مطرح می‌باشد (۴). این بیماری بطور وسیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری گسترش یافته است (۱۹,۲۳). پیروپلاسموزیس تک‌سمی‌ها ابتدا در قاره آسیا مشاهده گردید ولی با انتقال تک‌سمی‌های آلوده به سایر نقاط جهان از جمله نقاطی که دارای کنه‌های ناقل مناسب بودند این بیماری به سایر کشورهای مستعد انتقال پیدا کرد (۱۰). امروزه مناطق اندمیک قسمت‌های مختلفی از اروپا، آفریقا، آمریکای مرکزی، جنوبی و عربستان را شامل می‌شود (۵,۹,۱۰). کشورهای کانادا، نیوزلند، استرالیا، ژاپن، آلمان، انگلیس، ایرلند، هلند و کشورهای اسکاندیناوی کشورهایی هستند که این بیماری در آن‌ها دیده نمی‌شود (۱۰).

دوازده گونه از کنه‌های ایکسودیده از جنس‌های درماسنتور، ریپی سفالوس و هیالوما به عنوان ناقلین بابزیا اکوئی و بابزیا کابالی هستند (۱). این بیماری به فرم حاد، تحت حاد و مزمن اتفاق می‌افتد و میزان مرگ و میر ناشی از آن ۱۰ درصد تا ۵۰ درصد می‌باشد (۱۸). ملاحظه شده است که تیلریا اکویی پاتوژن تر از بابزیا کابالی است و باعث هموگلوبینوری و مرگ در اسب‌سانان می‌شود، در صورتی‌که بابزیا کابالی باعث یک سندرم مزمن در قالب تب و آنمی می‌شود (۲۵). اسب‌های بهبود یافته از آلودگی با بابزیا کابالی به مدت یک تا چهار سال حامل بیماری بوده در حالی‌که در اسب‌های آلوده شدن با تیلریا اکویی آلودگی در تمام طول عمر اسب‌ها ادامه دارد (۸). این بیماری از لحاظ اقتصادی و در تجارت اسب‌ها بین کشورهای مختلف دارای اهمیت زیادی می‌باشد (۷).

تشخیص پیروپلاسموزیس، به شناسایی بابزیا کابالی و تیلریا اکویی در گسترش خونی نازک و ضخیم رنگ‌آمیزی شده با گیمسا وابسته است (۳). اگرچه این روش ساده است اما برای تشخیص صحیح و شناسایی بابزیا کابالی و تیلریا اکویی در مواقعی که آلودگی مخلوطی از هر دو انگل می‌باشد و مخصوصاً در حالت حامل بودن حیوان با پارازیتمی پایین کفایت نمی‌کند (۲۰).

تکنیک‌های مولکولی آزمون‌های مفیدی جهت تشخیص پیروپلاسموز در اسب‌سانان می‌باشند. حساسیت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به اندازه‌ای

است که می‌تواند DNA انگل را در نمونه دارای ۲/۵ میلی‌لیتر خون با پارازیتمی یک در صد هزار گویچه شناسایی کند. (۲)

روش‌های مختلف تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تشخیص تیلریا اکویی و بابزیا کابالی در نمونه خون تکسمی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.(۱,۱۶)

روش کار

استان کردستان در غرب ایران، از شمال به استان‌های آذربایجان غربی و زنجان، از شرق به همدان و زنجان، از جنوب به استان کرمانشاه و از غرب به کشور عراق محدود است. شهرستان‌های این استان عبارتند از: بانه، بیجار، دهگلان، دیواندره، سروآباد، سقز، سنندج، قروه، کامیاران و مریوان.

در این بررسی از اردیبهشت تا شهریور که اوج فعالیت کنه‌ها در این ماه‌های سال اتفاق میافتد مجموعاً ۲۳۳ نمونه خون از الاغ‌های استان کردستان به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. جهت تهیه نمونه خون، از ورید وداج هر حیوان به میزان ۵ سی‌سی خون گرفته شد و پس از تهیه سه گسترش خونی از هر حیوان باقیمانده خون. به لوله آزمایش حاوی ۵ سی‌سی الکل اتیلیک ۷۰ درصد برای انجام آزمایشات مولکولی انتقال داده شد. همچنین در رابطه با هر نمونه اخذ شده کلیه اطلاعات مربوط از قبیل سن، جنس، نژاد ، منطقه جمع‌آوری، صاحب دام و تاریخ نمونه‌گیری در پرسشنامه ثبت و کد مربوطه بر روی نمونه‌ها درج گردید و به آزمایشگاه ارسال شد. دام‌ها از نظر سن (تعیین سن براساس وضعیت دندان‌های شیری و دائمی) به کمتر از دو سال، دو تا چهار سال و چهار سال به بالا دسته‌بندی شدند.

رنگ‌آمیزی گسترش‌های خونی با رنگ گیمسا

پس از انتقال گسترش‌های خونی به آزمایشگاه گسترش‌های را به مدت دو دقیقه در متانول خالص ثابت کرده و پس از خارج کردن از الکل در مجاورت هوا خشک کرده. سپس آن‌ها را به مدت ۴۵ دقیقه در رنگ گیمسا رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر پی اچ ۷/۲ (۰/۶۸۴ گرم دی سدیم فسفات + ۰/۲۵۸ مونوسدیم فسفات + یک لیتر آب مقطر) قرار دادیم. بعد از خروج از رنگ با آب شسته شده و سپس خشک شدند. از هر گسترش خونی ۱۰۰ میدان میکروسکوپی (تقریبا ۱۰۰۰۰ گلبول قرمز) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ با روغن امرسیون برای تعیین آلودگی به تک‌یاخته‌های خونی مورد مشاهده قرار گرفت. پارامترهای بیومتریک و مورفولوژیک شامل اندازه، محل و شکل انگل مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

استخراج DNA از نمونه خون

با استفاده کیت مخصوص استخراج DNA تولید شده در شرکت MBST ایران و طبق دستورالعمل آن DNA نمونه استخراج گردید.

ارزیابی DNA استخراج شده

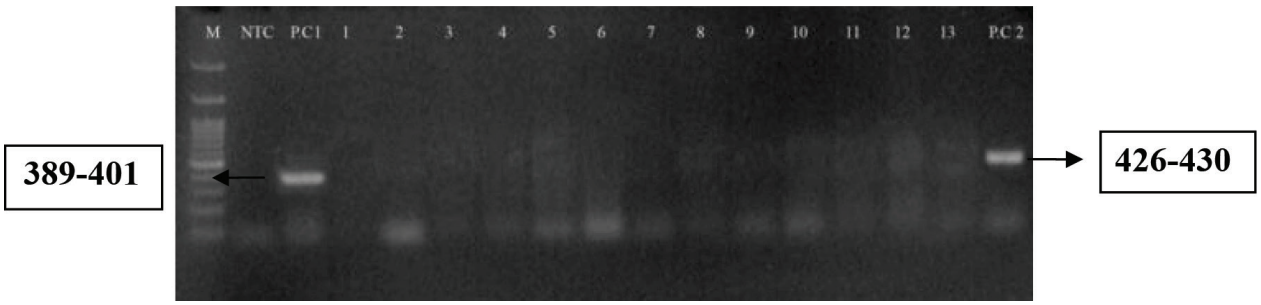
به این منظور دو پرایمر Tbs –S و Tbs –A جهت تکثیر قطعه‌های ۳۸۹-۴۰۱ جفت باز برای گونه‌های بابزیا و ۴۲۶-۴۳۰ جفت باز برای گونه‌های تیلریا از ژن 18S rRNA تیلریا اکویی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

بر روی هر نمونه یک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tbs-S وTbs-A منشعب از ژن کدکننده 18S rRNA انجام گرفت. در داخل هر تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری اختصاصی PCR، میزان ۱۲/۵مایکرولیتر Master mix و ۰/۵ مایکرولیتر از هر پرایمر Tbs-A 20µM و Tbs-S 20µM و آب به اندازه نه مایکرولیتر و ۲/۵ مایکرولیتر DNA الگو که حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر باشد اضافه کرده و بلافاصله در دستگاه ترموسیکلر تکثیر مکرر DNA انجام شد. جهت تایید صحت پرایمرهای مورد استفاده همزمان از کنترل مثبت تیلریا اکویی مربوط به یک راس اسب آلوده به تیلریا اکویی که با آزمایش مولکولی مورد تایید قرار گرفته بود استفاده گردید.

اندازه محصول PCR بر روی ژل آگارز در همه گونه‌های بابزیایی بین ۳۸۹-۴۰۱ جفت باز می‌باشد، در صورتی‌که در تیلریایی سنگین تر و ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز است (۱۲).

نتایج بررسی میکروسکوپی و مولکولی نمونه‌ها

از ۲۳۳ راس الاغ مورد آزمایش ۱۵۵ راس نر و ۷۸ راس ماده بودند که



نگاره ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن 18SrRNA تیلریا اکویی و بابزیا کابالی بوسیله پرایمرهای Tbs-S/Tbs-A با وزن ۴۳۰-۴۲۶ جفت باز و ۴۰۱-۳۸۹ جفت باز

M: مارکر ۱۰۰ جفت باز، چاهک NTC: کنترل منفی، چاهک PC1: کنترل مثبت بابزیا کابالی، چاهک ۱۳-۱: نمونه‌های خونی مورد آزمایش، چاهک PC2: کنترل مثبت تیلریا اکویی

جدول ۱- جدول توالی پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A

Primer name	Gene	('Nucleotide sequences (5' -3	Specificity
Tbs-S	18S rRNA	CAC-AGG-GAG-GTA-GTG-ACA-AG	Specific for Theileria sp. and Babesia sp
Tbs-A	18S rRNA	CTA-AGA-ATT-TCA-CCT-CTG-ACA-G	Specific for Theileria sp. and Babesia sp

۱۲۸ راس آن‌ها بین ۶-۲ سال و ۱۰۵ راس آنها بالاتر از ۶ سال سن داشتند و هیچکدام از آن‌ها زیر دو سال نبودند.

در بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی با توجه به پارامترهای بیومتریک و مورفولوژیک شامل اندازه، محل و شکل انگل در گلبول‌های قرمز، هیچگونه آلودگی به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی مشاهده نگردید. در بررسی‌های مولکولی و استفاده از روش مولکولی حاکی از آن بود که هیچ مورد از نمونه‌های خون آلوده به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی آلوده نبودند. بررسی مولکولی قطعات DNA ژنوم نمونه‌های خونی با استفاده از پرایمرهای Tbs-S و Tbs-A نشان داد که با وجود حضور قطعه۴۰۱-۳۸۹ و۴۳۰-۴۲۶ مربوط به ژنوم بابزیا و تیلریا بر روی ژل آگارز به عنوان شاهد مثبت، هیچ یک از نمونه‌های تحت مطالعه آلودگی به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی را نشان نداد (نگاره ۱).

بحث

استان کردستان یکی از استان‌های ایران است که در غرب کشور مجاور کشور عراق واقع شده‌است. از لحاظ اقلیمی و طبیعی استان کردستان منطقه‌ای کوهستانی می‌باشد که دشت‌های مرتفع و دره‌های پهن نیز در پهنه منطقه گسترده شده‌اند. تمام قلمرو استان در بهار و تابستان آب و هوایی خنک و معتدل دارد. مردم در مناطق روستایی از حیوانات جهت نقل و انتقال وسایل و کالا استفاده می‌کنند. اما امروزه با توجه به توسعه در این مناطق، وسائط نقلیه و اتومبیل جایگزین حیوانات در این مناطق شده‌اند. به همین دلیل جمعیت تک‌سمی‌ها بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرده است.

مطالعات کمی با استفاده از روش‌های مولکولی در سطح جهان بر روی تک‌یاخته‌های خونی الاغ صورت گرفته است و عمده روش‌های مورد استفاده روش گسترش خونی یا سرولوژیکی می‌باشد. در این مطالعه دو روش تشخیصی شامل گسترش خونی که معمول‌ترین روش جهت تشخیص تک‌یاخته‌های خونی می‌باشد و تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که یک روش اختصاصی با حساسیت بالا می‌باشد مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند. نتایج روش‌های میکروسکوپی و مولکولی حاکی از آن بود که هیچ‌کدام از نمونه‌های خون آلوده به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی نبودند.

بالکایا و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی الاغ‌های استان ارزروم در شرق ترکیه انجام دادند از ۹۲ نمونه گسترش خونی مورد آزمایش هیچکدام به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی آلوده نبودند (۶).

دو مطالعه بر روی الاغ‌های کشور اتیوپی توسط مکاییب در سال ۲۰۱۰ و تفرا در سال ۲۰۱۱ با استفاده از روش گسترش خونی انجام شد که نتایج حاصل از بررسی مکاییب میزان آلودگی به تیلریا اکویی را ۲/۰۸ درصد و بابزیا کابالی را ۱/۰۴ درصد نشان داد و در مطالعه تفرا میزان آلودگی به هر دو تک یاخته در مجموع ۱/۷۵ درصد بود (۱۴, ۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر که ژانگ و همکاران با استفاده از روش مولکولی بر روی حیوانات مختلف در جزایر کارایب انجام دادند از ۲۵ راس الاغ مورد آزمایش ۵ راس آلوده به تیلریا اکویی بودند و آلودگی به بابزیا کابالی مشاهده نشده است (۲۵).

بررسی‌های صورت گرفته در ایتالیا با استفاده از همین روش میزان آلودگی به تیلریا اکویی و بابزیا کابالی را به ترتیب ۱۷/۴ درصد و ۳/۶ درصد نشان داده (۱۱) و همچنین در سودان شیوع تیلریا اکویی ۲۳/۶ درصد گزارش شده ولی آلودگی به بابزیا کابالی مشاهده نشده است.(۱۷)

در مطالعه‌ای دیگر که عابدی و همکاران بر روی ۱۰۶ راس الاغ در استان خراسان شمالی با استفاده از روش گسترش خونی انجام دادند تعداد ۴ مورد مثبت گزارش شده است که شیوع اندکی در این منطقه به حساب می‌آید (۲).

تیلریا اکویی و بابزیا کابالی علاوه بر الاغ سایر تک‌سمی‌ها از جمله اسب‌ها را هم می‌توانند آلوده کنند. مطالعات قبلی در ایران بیشتر بصورت گزارش موردی هستند از جمله گزارشات موردی توسط نوری (۱۹۹۳)، اصلانی (۲۰۰۰)، سیفی (۲۰۰۰)، سخا (۲۰۰۷)، ارفعی آخوله (۲۰۱۳) و کاکه خانی (۲۰۱۵).

از دیگر مطالعات بر روی اسب‌ها می‌توان به بررسی حبیبی و همکاران و همچنین ملکی فرد و همکاران اشاره کرد که میزان آلودگی را با استفاده از روش مولکولی به ترتیب ۹۶/۷ درصد و ۱۰/۸۳ درصد برای تیلریا اکویی گزارش کردند (۱۲،۱۳).

پیروپلاسموزیس گسترش زیادی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دارد اما در مناطق با آب و هوایی معتدل گسترده نمی‌باشد (۱۵). گسترش و حضور این بیماری به وجود کنه‌های ناقل آن بستگی دارد. هر دو انگل ناقل یکسانی دارند اما تیلریا اکویی از نظر جغرافیایی، پراکندگی وسیعی نسبت به بابزیا کابالی دارد.

در مطالعه‌ای که بهرامی و همکاران بر روی جمعیت کنه‌های ناقل انجام دادند مشاهده کردند که رابطه معکوسی بین ارتفاع و جمعیت کنه‌ها وجود دارد و اعلام داشتند که به احتمال زیاد افزایش ارتفاع در سیر تکاملی کنه‌ها اختلال ایجاد می‌کند و این افزایش ارتفاع می‌تواند در کاهش تعداد کنه‌ها و به طبع آن کاهش آلودگی به تک‌یاخته‌های خونی ناشی از کنه‌ها در تک سمی‌ها نقش ایفا کند (۵).

بنابراین یکی از دلایل مهم جهت عدم آلودگی به تک‌یاخته‌های خونی

در الاغهای استان کردستان می‌تواند به علت کوهستانی و مرتفع بودن زیستگاه الاغهای این استان باشد که باعث اختلال در سیر تکاملی کنه‌ها و کاهش جمعیت آن‌ها می‌گردد. از سوی دیگر جنین می‌توان نتیجه گرفت که الاغهای استان کردستان از لحاظ ژنتیکی نسبت به الودگی تک‌یاخته‌ای بسیار مقاوم بوده و همچنین به دلیل شرایط اقلیمی و استفاده از آن‌ها در مناطق کوهستانی، احتمالا نمی‌توانند به عنوان یک میزبان مخزن برای این گونه از تک‌یاخته‌ها قلمداد شوند، که البته این فرضیه نیازمند مطالعه و بررسی بیشتر می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N., Igarashi, I. (2005): Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of Babesia caballi and Babesia equi in horse blood. *Vet Parasitol* 129:43–49

2. Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N.T., Thekisoe, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Igarashi, I. (2007): Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol Res* 100:1165–1168

3. Ali, S., Sugiomoto, C., Onuma, M. (1996): Equine piroplasmosis. *J Equine Sci* 7:69–70

4. Avarzed, A., de Waal, D.T., Igarashi, I., Saito, A., Oyamada, T., Toyoda, Y.,Suzuki, N. (1997): Prevalence of equine piroplasmosis in central Mongolia. *Onderstepoort J Vet Res* 64:141–145

5. Bahrami, S., Ghadrdan, A.R., Mirabdollahi, S.M., Fayed, M.R. (2014): Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Trop Biomed* 31, 110-117.

6. Balkaya I, Utuk A,E, Piskin F,C (2010) Prevalance of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Donkeys from Eastern Turkey in Winter Season. *Pak Vet J,* 30(4): 245-246.

7. Chahan, B., Zhang, S., Seo, J.Y., Nakamura, C., Zhang, G., Bannai, H., Jian, Z., Inokuma, H., Tuchiya, K., Sato, Y., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T., Xuan, X. (2006): Seroepidemiological evidence for the possible presence of *Babesia (Theileria) equi* and *Babesia caballi* infections in Donkeys in Western Xinjiang, China. *J. Vet. Med. Sci.* 68(7), 753-755.

8. De Waal, D. T., (2004): Global importance of piroplasmosis. *Journal of Protozoology Research;* 10: 106-127.

9. De Waal, D.T., 1992. Equine piroplasmosis: A review. *British Veterinary Journal* 148, 6-14.

10. Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., and Muller, I. 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. 9: 1187-1194.10. Hailat, N.Q., Lafi, S.Q.,

11. Laus, F., Spaterna, A., Faillace, V., Veronesi, F., Ravagnan, S., Beribé, F., Cerquetella, M., Meligrana, M. and Tesei, B. (2015): Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Veterinary Research*; 11:100

12. Habibi, Gh., Esmaeilnia, K., Hablolvarid, M.H., Afshari, A., Zamen, M., Bozorgi, S. (2016): Microscopic and Molecular Detection of *Theileria (Babesia) equi* Infection in Equids of Kurdistan Province, Iran. *Iran J Parasitol*: Vol. 11, No. 1, pp.86-90

13. Kakekhani, S., Rahbari, S., Madani, R., Bokaei, S.(2017): Molecular and microscopic detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Kurdestan Province, Iran. *Archives of Razi Institute,* Vol. 72, No. 1, 51-55

14. Mekibib, B., Manegerew, M., and Tadesse, A. (2010): Prevalence of haemoparasite and associated risk factors in working donkeys in Adiguden and Kwiha districts of Tigray region, Northern Ethiopia. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 2249-2255.

15. Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P., and Pietrobelli, M. (2010) Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: A preliminary study. *Vet. J.* 184: 346-350.

16. . Nicolaiewsky, T.B., Richter, M.F., Lunge V.R.(2001):Detection of Babesia equi (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.*, v.101, p.9-21

17. Osman, A., El Ghali, A., Salim, B. (2016): Parasitological and Molecular Detection of Equine Piroplasmosis in Horses and Donkeys in South Darfur State, Sudan. Sudan *J. Vet. Res*. 31: 21-28.

18. Phipps, L.P., Otter, A., (2004):. Transplacental transmission of Theileria equi in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 154, 406-408.

19. Preston, P.M. (2001): Theileriosis. In: Service MW (ed) Encyclopedia of arthopod-transmitted infections of man and domestic animals. CABI, Wallingford, pp 487–502

20. Seifi, H.A., Mohria, M., Sardaria, K. (2000): A mixed infection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in a racing colt: a report from Iran. *J. Equine Vet Sci* 20:858–860

21. Soulsby E.J.L.(1982): Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th ed. London, UK: Bailliere Tindall; pp. 706–728.

22. Tefera, M., Worku, A., and Tolosa, M.(2011): Prevalence and risk factors for donkey babesiosis in and around Debre Zeit, Central Ethiopia. *Vet. Res.* 4: 56-60.

23. Uilenberg, G. (2001): Babesiosis. In: Service MW (ed) Encyclopedia of arthropod-transmitted infections of man and domestic animals. CABI, Wallinford, pp 53–60

24. Xuan, X., Igarashi, I., Avarzed, A., Ikadai, N., Inoue, N., Naga-

25. Zaugg, J.L., Lane, V.M. (1992): Efficacy of buparvaquone as a therapeutic and clearing agent of Babesia equi of European origin in horses. *Am J Vet Res* 53:1396–1399.

sawa, H., Fujisakai, K., Toyoda, Y., Suzuki, N., Milkami, T. (1998): Diagnosis of Babesia caballi infection in horses by polymerase chain reaction. *J Protozool Res* 8:85–89