مقایسه روش میکروسکوپی وPCR در تشخیص آلودگی گوسفندان حامل تیلریا و بابزیا در پنج منطقه شهرستان خرم آباد

شهریار یاوری[1*]،پرویز شایان[2]،سعید بکایی[3] و نرگس امینی نیا[4]

(تاریخ دریافت: 91/3/3؛ تاریخ پذیرش: 91/4/2)

چکیده:

این مطالعه به بررسی میزان گوسفندان آلوده و حامل تک یاخته تیلریا و بابزیا در خرم آباد باروش PCR و مقایسه آن با روش میکروسکوپی می پردازد. در طی تحقیق، از نمونه خون 100 رأس گوسفنددر 5 منطقه ی دامپروری این شهرستان DNA استخراج و با آنالیز برروی ژل آگارز تأیید و طی PCR با پرایمرهای ß.actin از لحاظ کمی و کیفی آزمایش شد. سپس برای تشخیص وجود پیرو پلاسم‌ها، DNA استخراج شده از نمونه های خونی با پرایمرهای طراحی شده از توالی نوکلئوتیدی محیط کننده ناحیه متغیر ژن 18S rRNA بابزیا و تیلریا با روش PCR تکثیر داده بر روی ژل آگارز با استفاده از اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV ارزیابی گردید. در این مطالعه نمونه ها ابتدا با روش مشاهده میکروسکوپی گسترش نازک خون محیطی رنگ‌آمیزی شده بررسی شدند که در 15 گسترش خونی اجرام پیروپلاسمی قابل رویت بودند. در 12 گسترش خونی از نمونه های مثبت اجرام تیلریایی و در 3 نمونه اجرام بابزیایی مشاهده گردیدند. با روش PCR ، 28 نمونه خونی مثبت ارزیابی شدند که 22 نمونه (22%) از آن به تیلریا و 6 نمونه (6%) به بابزیا آلوده بودند. میزان توافق ظاهری دوتست برابر 81% می باشد ودرصورتیکه PCR به عنوان یک آزمون طلایی درنظر گرفته شود میزان حساسیت و ویژگی تست آزمایش مستقیم به ترتیب 42/9% و 95/8% محاسبه می گردد.

کلمات کلیدی: تیلریا، بابزیا، پیرو پلاسموز، PCR

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

2- مرکز مطالعات کنه و بیماریهای منتقله از آن، گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

3- گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

4- مرکز مطالعات کنه و بیماریهای منتقله از آن، گروه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

*:مسئول مکاتبات؛ پست الکترونیکی:Shahriar.yavari@yahoo.com

مقدمه

پیرو پلاسموز بیماری گوسفند و دیگر نشخوار کنندگان است که از طریق کنه از حیوانی به حیوان دیگر منتقل شده وشامل تیلریا و بابزیا می باشد. بیماری های ناشی از این اجرام پاتوژن سالانه خسارت اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری جهان وارد می‌کند. ایران با داشتن ده‌ها میلیون گوسفند و بز از قطب‌های بزرگ دامپروری از لحاظ پرورش نشخوار کنندگان کوچک در جهان است. از مناسب‌ترین مناطق آب و هوایی برای سیستم پرورشی چرای آزاد و مرتعی در ایران استان لرستان است که واحد دام در هر کیلومتر آن 3/5 برابر میانگین کشورمی باشد و چند هزار تن در سال تولید شیر و گوشت دارد. پیروپلاسم‌های خونی از عوامل تضعیف کننده تولید محصولات این صنعت می‌باشند و گوسفندان حامل و بدون علامت نیز در ماندگاری و گسترش این بیماری دخیل هستند.

میزان تولید محصولات گوسفند شهرستان خرم‌آباد در سال 1389عبارتند از شیرخام 4302 تن و گوشت قرمز 4585 تن (با استناد به اطلاعات امور دام شهرستان خرم‌آباد). در حالی‌که 1/73 درصد وسعت کشور در استان لرستان واقع شده است با دارا بودن 6/5 میلیون واحد دامی 5/5 درصد جمعیت دامی کشور را در خود جای داده و دارای رتبه ششم در بین استان‌های کشور است. میانگین واحد دامی استان لرستان در هر کیلومتر 231 واحد است در حالی که این میزان در کشور 86 واحد می‌باشد. 72 درصد واحد دامی لرستان گوسفند و بز هستند. دراین استان به دلیل سیستم پرورشی چرای آزاد، چرای مرتعی و وجود کنه‌های میزبان ناقل پیروپلاسم‌های خونی، هرساله خسارت جبران‌ناپذیری به این صنعت وارد می‌کند. هدف این بررسی مقایسه روش های میکروسکوپی وPCR در تشخیص گوسفندان آلوده و بدون علامت منطقه مذکور بود.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

از 100 راس گوسفند به ظاهر سالم پنج منطقه دامپروری خرم آباد از اواسط اردیبهشت تا اوسط خرداد ماه به صورت تصادفی نمونه خون گرفته شد و با اتانول 70 درصد فیکس گردید.از خون محیطی آنها نیز دو عدد گسترش نازک تهیه گردید.

رنگ آمیزی گسترش های خون با رنگ گیمسا

در آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، لام های خونی در سبد رنگ آمیزی چیده شده و جهت فیکس کردن به مدت 3 دقیقه در متانول خالص قرار گرفتند. به مدت 45 دقیقه با رنگ گیمسا رقیق شده به نسبت 1 به 10 با بافر گیمسا رنگ آمیزی گردیدند. گسترش های خونی از نظر وجود پیروپلاسم ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج DNA از خون

حدود 200 میکرولیتر از نمونه خون در تیوب 1.5 میلی لیتر استریل ریخته و با سانتریفوژ 8000 دور به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد الکل رویی آن با سمپلر خارج، تیوب با درب باز برای تبخیر کامل الکل در محیط زیر هود قرار گرفت و با کیت مخصوص استخراج DNA (MBST, Iran) و طبق دستورالعمل کیت، DNA نمونه استخراج گردید و بر روی ژل آگارز 1% با استفاده از اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV ارزیابی شد.

ارزیابی کیفی DNA استخراج شده با استفاده از آغازگر های ß- actin

جهت بررسی کنترل کیفی نمونه های DNA استخراج شده، یک جفت پرایمر (جدول 1) جهت انجام واکنش PCR بر روی ژن β-actin طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید. 10 ng از DNA استخراج شده در یک محلول واکنش 100 میکرولیتری شامل 10 میکرولیتر بافر 10 X PCR، 2.5 U Taq polymerase (Cinnagen, Iran)، 2 میکرولیتر از 20µM از هر پرایمر sense و antisense سنتز شده، 2 میکرولیتر از 20 mM از هر یک از دزوکسی ریبونوکلئوتید های dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Fermentas) و 1.5 mM از محلول MgCl2 (Cinnagen, Iran) در دستگاه ترموسایکلر (MWG Biotech Primus, Germany) با استفاده از برنامه طراحی شده جهت واکنش به صورت زیر انجام گرفت:

5 دقیقه دمای 95 درجه سانتی گراد جهت دناتوراسیون و جداسازی کامل دو رشته DNA از یکدیگر (Denaturation step)، سپس 35 سیکل متشکل از 45 ثانیه دمای 95 درجه سانتی گراد، 45 ثانیه دمای 66 درجه سانتی گراد جهت اتصال پرامر الیگونوکلئوتیدی به تک رشته DNA (Annealing step)، 45 ثانیه دمای 72 درجه سانتی گراد جهت انجام واکنش همانند سازی و در انتهای 35 سیکل، 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد جهت همانند سازی کامل محصول PCR. پس از اتمام واکنش، 10 میکرولیتر از محصول PCR با 2 میکرولیتر DNA Loading buffer مخلوط شد و روی ژل آگارز 1.5% در کنار 4 میکرولیتر از مارکر 100bp در گوده های مجزا ریخته شد و به مدت 30 دقیقه با ولتاژ 100 ولت الکتروفورز گردید. در خاتمه ژل مورد نظر پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی حضور پیروپلاسم ها در نمونه های اخذ شده با استفاده از روش PCR

در ابتدا یک جفت پرایمر (جدول 1) جهت انجام واکنش PCR بر روی ژن 18S rRNA که بصورت مشترک در این ژن در بابزیا و تیلریا موجود می باشد طراحی گردید و توسط شرکت سیناژن سنتز و در دسترس قرار گرفت. از آنجایی که اندازه

جدول1: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Name of Primer	Accession No. in Gen Bank	NucleotidSeguences	PCR-Product
ß- actin all Sense	U39357.1	5′-ACCCACACGGTGCCCATCT -3′	۲۰۰bp
ß- actin all anti - sense	U39357.1	5′-CGGAACCGCTCATTCC-3′	۲۰۰bp
Babesia/ theileria all Sense	AY260178	5/-CACAGGGAGGTAGTGACAA-3/	389-401bp(Bab.)
Babesia/theileria all anti Sense	AY260178	5/-CTAAGAATTTCACCTCTGACA-3/	426-430bp(Theil.)

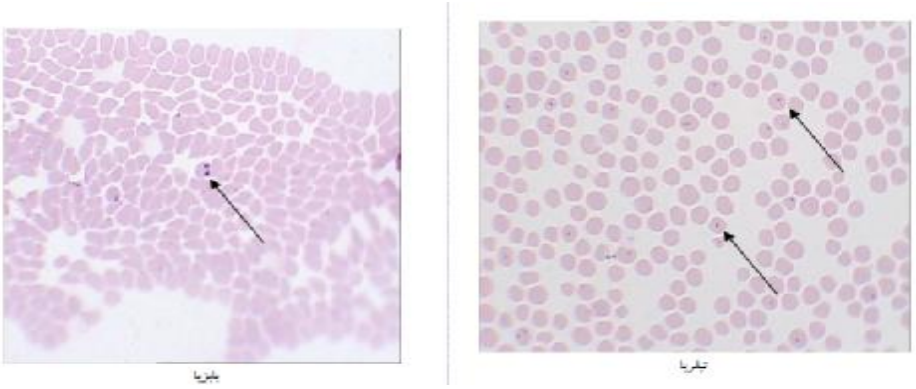
محصول PCR در بابزیا بین 389 bp-401 bp و در تیلریا بین 426 bp- 430 bp می باشد، می توان با این تک جفت پرامر به صورت همزمان بین بابزیا و تیلریا تمایز داد (8). 10 ng از DNA استخراج شده در یک محلول واکنش 100میکرولیتری شامل 10 میکرولیتر بافر 10 X PCR، 2.5 U Taq polymerase (Cinnagen, Iran)، 2 میکرولیتر از 20µM از هر پرایمر sense و antisense سنتز شده، 2 میکرولیتر از 20 mM از هر یک از دزوکسی ریبونوکلئوتید های dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Fermentas) و 1.5 mM از محلول MgCl2 (Cinnagen, Iran) در دستگاه ترموسایکلر (MWG Biotech Primus, Germany) با استفاده از برنامه طراحی شده جهت واکنش به صورت زیر انجام گرفت:

5 دقیقه دمای 95 درجه سانتی گراد جهت دناتوراسیون و جداسازی کامل دو رشته DNA از یکدیگر (Denaturation step)، سپس 35 سیکل متشکل از 45 ثانیه دمای 95 درجه سانتی گراد، 45 ثانیه دمای 56 درجه سانتی گراد جهت اتصال پرامر الیگونوکلئوتیدی به تک رشته DNA (Annealing step)، 45 ثانیه دمای 72 درجه سانتی گراد جهت انجام واکنش همانند سازی و در انتهای 35 سیکل، 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد جهت همانند سازی کامل محصول PCR. پس از اتمام واکنش، 10 میکرولیتر از محصول PCR با 2 میکرولیتر DNA Loading buffer مخلوط شد و روی ژل آگارز 1/5% در کنار 4 میکرولیتر از مارکر 100bp در گوده های مجزا ریخته شد و به مدت 30 دقیقه با ولتاژ 100 ولت الکتروفورز گردید. در خاتمه ژل مورد نظر پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

ارزیابی گسترش های خونی با روش رنگ آمیزی گیمسا

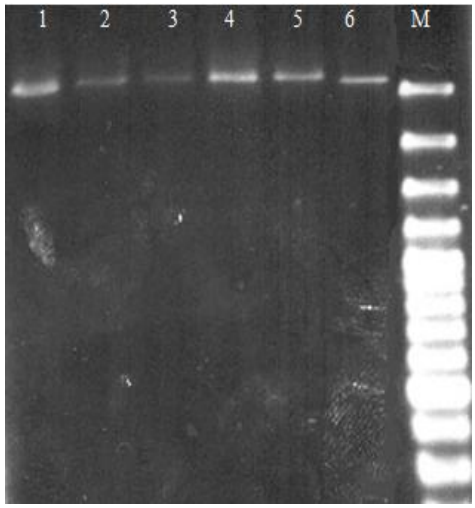
از 100 نمونه خون محیطی گسترش خونی تهیه شد و پس از رنگ آمیزی لام های بدست آمده به روش گیمسا با استفاده از عدسی 100 میکروسکوپ نوری، گلبول های قرمز مورد بررسی قرار گرفتند. در 15 گسترش خونی اجرام پیروپلاسمی مشاهده گردید. در 12 گسترش از 15 گسترش اجرام تیلریایی (تصویر 1) و در 3 گسترش اجرام بابزیایی (تصویر 1)قابل رویت بودند.



تصویر 1: اجرام تیلریایی و بابزیایی در گسترش های خونی

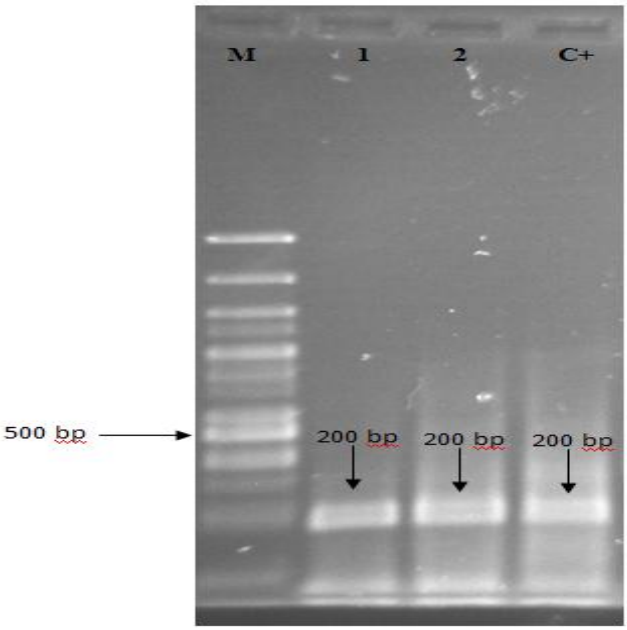
بررسی خون محیطی با روش PCR

از 100 نمونه خونی تثبیت شده در اتانول DNA استخراج و بر روی ژل آگارز با استفاده از اتیدیوم بروماید تحت اشعه UV ارزیابی گردید. تصویر 2 نشان می دهد که DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز 1% قابل رویت می باشد.



تصویر 2: الکتروفورز نمونه های DNA استخراجی M– مارکر شماره های 1 تا 6 نمونه های DNA استخراج شده

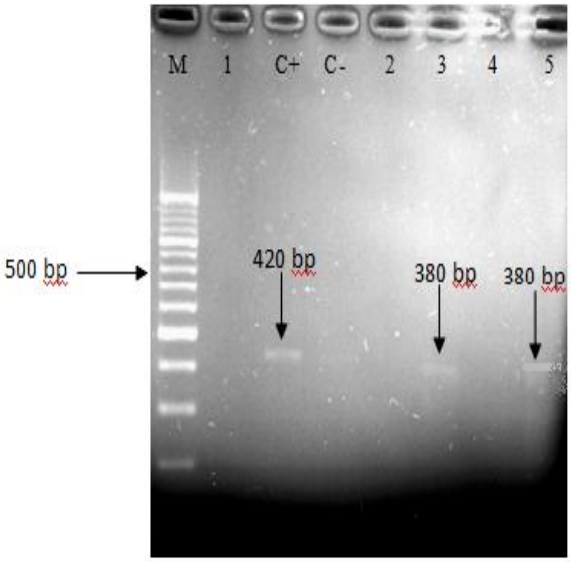
جهت تعیین ارزیابی کیفیت DNA، DNA های استخراج شده با پرایمر های اختصاصی برای ژن β-actin تکثیر شدند. تصویر 3 نشان می دهد که DNA های استخراج شده قابلیت تکثیر شدن با پرایمرهای مورد استفاده را دارند.



تصویر 3: آنالیز کیفیت DNA استخراجی PCRبا آغازگرهایß-actin

پس از اینکه DNA های استخراج شده از لحاظ کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند، آنها با پرایمرهای اختصاصی برای ژن 18S rRNA تیلریا و بابزیا آنالیز شدند.

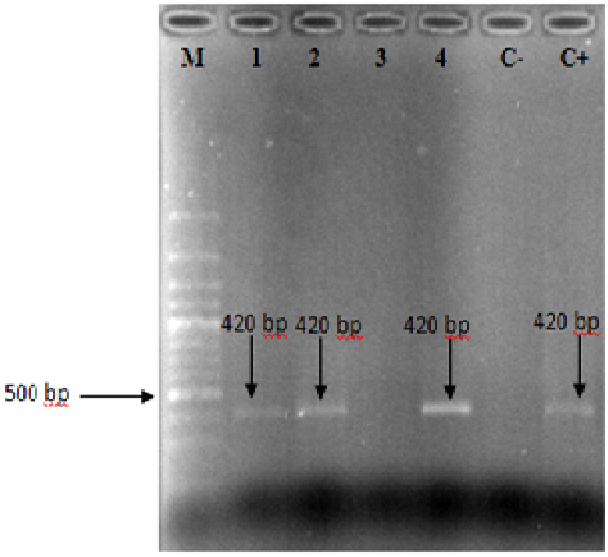
در بررسی PCR از 100 نمونه DNA استخراج شده، در 6 نمونه خونی محصول PCR اختصاصی برای پیروپلاسم بابزیا تکثیر داده شد (تصویر 4).



تصویر 4: بررسی تکثیر DNA تیلریا و بابزیا با جفت آغازگر Babesia / theileria all نمونه های 3 و 5 بابزیا مثبت می باشند

PCR با DNA استخراج شده از نمونه های خون محیطی نشان داد که 22 نمونه قابل تکثیر بودند.

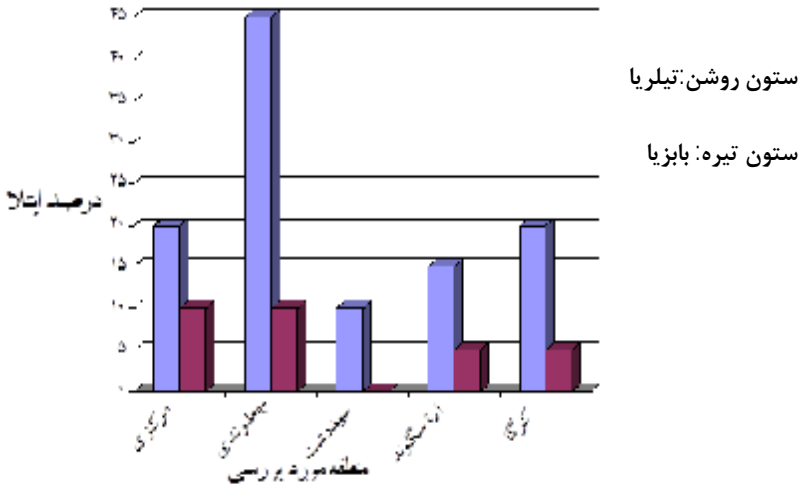
اندازه محصولات PCR در این نمونه ها با اندازه تعیین شده برای تیلریا همخوانی داشت (تصویر 5).



تصویر 5: M مارکر 100 bp ، C^+ :کنترل مثبت ، C^- :کنترل منفی، نمونه های 1 ، 2 و4: تیلریا مثبت

میزان توافق ظاهری دوتست برابر 81% می باشد ودرصورتیکه PCR به عنوان یک آزمون طلایی درنظر گرفته شود میزان حساسیت و ویژگی تست آزمایش مستقیم به ترتیب 42/9% و 95/8% محاسبه می گردد.

بررسی آلودگی گوسفندان 5 منطقه نمونه برداری شده با روش PCR نشان داد که آلودگی به تیلریا در منطقه چغلوندی با45% بیشترین وسپیددشت با 10% کمترین آلودگی را داشتند (نمودار 1).



نمودارشماره1- آلودگی به تیلریا و بابزیا باروش PCR در مناطق مورد مطالعه

جدول 2 توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به تیلریا و بابزیا برحسب نتایج PCR و ME را نشان می دهد. در جداول3و 4 توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به تیلریا برحسب نتایج PCR و ME، و توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به بابزیا برحسب نتایج PCR و ME آورده شده است.

جدول 2- توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به تیلریا و بابزیا برحسب نتایج PCR و ME

	نتیجه PCR					
	مثبت		منفی		**جمع**	
نتیجه ME	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مثبت	12	12	3	3	15	15
منفی	16	16	69	69	85	85
جمع	28	28	72	72	100	100

طبق جدول3 میزان توافق ظاهری دوتست برابر 81% می باشد و مقدار آماره کاپا نیز 451/ 0 می باشد(توافق متوسط). اما آزمون مک نمار اختلاف دو تست را معنی دار دانست ($P<0.01$). ودرصورتیکه PCR به عنوان یک آزمون طلایی درنظر گرفته شود میزان حساسیت و ویژگی آزمایش میکروسکوپی به ترتیب 9/42% و 8/95% محاسبه می گردد.

جدول3- توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به تیلریا برحسب نتایج PCR و ME

	نتیجه PCR					
	مثبت		منفی		**جمع**	
نتیجه ME	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مثبت	9	9/6	3	3/2	12	12/8
منفی	13	13/8	69	73/4	82	87/2
جمع	22	23/4	72	76/6	94	100

طبق جدول4 میزان توافق ظاهری دوتست برابر 83% می باشد و مقدار آماره کاپا نیز 436/0 می باشد(توافق متوسط) اما آزمون مک نمار اختلاف دو تست را معنی داردانست ($P<0.05$). ودرصورتیکه PCRبه عنوان یک آزمون طلایی درنظر گرفته شود میزان حساسیت و ویژگی آزمایش میکروسکوپی به ترتیب 41% و 8/95% محاسبه می گردد.

جدول4- توزیع فراوانی مطلق ونسبی آلودگی به بابزیا برحسب نتایج PCR و ME

	نتیجه PCR					
	مثبت		منفی		**جمع**	
نتیجه ME	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مثبت	3	4	0	0	3	4
منفی	3	4	69	92	72	96
جمع	6	8	69	92	75	100

طبق جدول4 میزان توافق ظاهری دوتست برابر 96% می باشد و مقدار آماره کاپا نیز 684/0 می باشد (توافق اساسی) آزمون مک نمارنیز اختلاف دو تست را معنی دار دانست ($P=0.250$).

ودرصورتیکه PCR به عنوان یک آزمون طلایی درنظر گرفته شود میزان حساسیت و ویژگی تست آزمایش مستقیم به ترتیب 50% و 100% محاسبه می گردد.

بحث

Altay و همکاران(2008) و Aktash و همکاران بیان کرده اند که تشخیص گونه های تیلریا و بابزیا و شناسایی دامهای حامل به وسیله مشاهده میکروسکوپی بسیار مشکل یا غیر ممکن می باشد(10و7). با این حال شایان و رهبری (2005) نشان دادند که می توان از گسترش های خونی رنگ آمیزی شده DNA استخراج و آنالیز کرد و گونه های تیلریا و بابزیا را با روش PCR تشخیص داد(11).در سال 2006 تئودور پلوس و همکاران حساسیت PCR را برای تشخیص بابزیا اویس 10^{-7} اعلام کردند(12). در یک بررسی که نویدپور (1375) بر روی کبد گوسفندان ارجاعی به کشتارگاه اهواز انجام داد، 9/4 درصد کبدها به اجسام آبی کخ (شیزونت تیلریا) آلوده بودند (6). تقریبا به نتایج روش میکروسکوپی این تحقیق نزدیک است. در بررسی حاجیکلایی وهمکاران (1379) فراوانی آلودگی گوسفندان بدون علامت آلوده به تیلریا در کشتارگاه قائم‌شهر 13% بودکه با روش میکروسکوپی در مورد تیلریا در این تحقیق همخوانی دارد(3). حیدر پور و همکاران الودگی به تیلریا را درگوسفندان زابل، لار، فردوس، سمنان و گرگان با روشهای NPCR و میکروسکوپی به ترتیب60% و22.27% بیان داشتند که نتایج روش میکروسکوپی آنها باروش PCR این تحقیق همخوانی دارد(8). طی تحقیقی که زیور صادقی دهکردی و همکاران(1389) در گوسفند دارای علائم ایران داشتند طبق مشاهدات میکروسکوپی 24/68 درصد بابزیا و تیلریا(26%) گزارش کردند و با روش Nested – PCR نیز کار را تکرار کردند 5/58% به بابزیا و53% به تیلریا الوده بودندونتایج تشخیص بابزیا با روشNested – PCR باروشPCRدرموردبابزیا دراین تحقیق همخوانی دارد(4).حاج حسینلو در سال 1374 در بررسی مشاهده مستقیم بابزیا در گوسفند به روش میکروسکپی در کشتارگاه ارومیه را 6/31 و درصد اعلام نموده است (2). نتایج وی با روشPCRاین تحقیق همخوانی دارد.در سال 1376، غیاثی در بررسی 850 رأس گوسفند با روش میکروسکپی در شهرستان ارومیه (7/05 درصد) را به بابزیا آلوده تشخیص داد که این نتایج نیز با روش PCR این تحقیق درمورد بابزیا همخوانی دارد(5). در سال 1377 توسلی و رهبری با مطالعات سرواپیدمیولوژیک در تمام مناطق آب و هوایی ایران به‌ویژه مناطق کوهستانی عفونت بابزیا اویس را گزارش کردند در مطالعه مذکور که در 12 استان کشور در 4 منطقه آب و هوایی بر روی 1639 رأس گوسفند انجام شد، آلودگی را در منطقه یک (سواحل دریای خزر) 15/93 درصد در منطقه دو (منطقه کوهستانی) 58/81 درصد، در منطقه سه (سواحل خلیج‌فارس) 12/04 درصد و در منطقه چهار (کویر مرکزی) 13/22 درصد عنوان شد ونتایج با هیچکدام از نتایج این تحقیق همخوانی ندارد(1).

تقدیروتشکر

بدین وسیله از همکاری آقای مهندس اسدالهی مدیر اموردام جهادکشاورزی استان لرستان قدردانی می گردد.

منابع

1- توسلی، م. 1377. بررسی سرواپیدمیولوژیک بابزیا اویس در گوسفندان مناطق مختلف اقلیمی ایران با استفاده از تست ایمونوفلورسنت غیرمستقیم (IEAT). پایان‌نامه شماره 69 جهت دریافت دکتری تخصصی انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

2- حاج حسین‌لو، م. 1374. بررسی کشتارگاهی بابزیوز گوسفند و بز در شهرستان ارومیه، پایان‌نامه شماره 176، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، صفحه 42.

3- حاجی کلایی، م. چنگیزی، ع. لطف‌الله‌زاده، ص. مرزبان، ک. 1382. بررسی فراوانی آلودگی به تیلریا در گوسفند و ارتباط متقابل آن با یافته‌های بالینی در کشتارگاه قائم‌شهر. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره 58، شماره 2.

4- صادقی دهکردی، ز. رهبری، ص. ذاکری، ص.1389. بررسی مرفومتریک و بیولوژی مولکولی بابزیای گوسفند در ایران. هفتمین همایش سراسری و دومین کنفرانس منطقه‌ای بیماری‌های انگلی ایران.

5- غیاثی، ف. 1376. تعیین گونه‌های عامل با بابزیوز گوسفندی و چگونگی پراکندگی کنه‌ها در گوسفندان بیمار شهرستان ارومیه. پایان‌نامه شماره 428 دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه.

6- نویدپور، ش. 1375. بررسی آلودگی تیلریای گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه اهواز. پژوهش و سازندگی. شماره 31. صفحه 81 – 78.

7- Aktas, M.K., Dumanli, N., 2005. Development of polymeras chain, reaction method for diagnosis of BabesiaOvis infection in sheep and goat veterinary parasitology.104:259– 263.

8-Hadadzadeh, H.R., KHazrainia, P., Haidarpour, M .Zaeemi, M., 2010.geographic distribution of different theileria species in sheep in iran. Fourth asian congress of tropical medicine and paracitology

9- Hadethi, A.H., and Saffar, T.M., 1988. Prevalence of parasitic infection of sheep in norther Irag. Veterinary parasitology. 2(2): 93 – 95

10- Karst,A., Munir,A., 2008. Corrigendum to Molecular Detection of Theileria and Babesia in cattle .venrrinary Parasitol. 158 (4) :295– 301.

11- Shayan, p., and Rahbari, S., 2005. Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia on stained blood smear using PCR. parasitology Research. 97 (4): 281 – 6.

12- Theodoropoulos, G., Gazuali, M., Ikonomopoules, J. A., Kantzoura, V., and Kominakis, A., 2006. Determination of prevalence and risk factors of imfection with Babesia in small ruminant from Greece by polymerase Chain reractionamflication. Veterinary parasitology .135 (2): 99 – 104.