Iranian Journal of Animal Science
Vol 52, No 4, Winter 2022 (253-260)
DOI: 10.22059/ijas.2021.329716.653845

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۴، زمستان ۱۴۰۰ (ص ۲۶۰-۲۵۳)

مقاله پژوهشی:

بررسی میزان آلودگی به *هپاتوزئون کنیس* در سگ‌های شهرستان ارومیه

محمدرضا زینالی[۱]، فرناز ملکی فرد[۲*]، آلاله رخشانپور[۳] و محمد یخچالی[٤]
۱، ۲ و ٤. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، استادیار و استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/٦/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۷/۱٤)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی سگ‌های شهرستان ارومیه به عفونت مزمن حاصل از تک یاخته‌ای *هپاتوزئون کنیس* بود. در طی سالهای ۱۳۹۷-۱۳۹۸، نمونه‌های خون اخذ شده از سگ‌های شهرستان به وسیله روش‌های ریزبینی و مولکولی مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین تاثیر سن، جنس، نوع زندگی و آلودگی به کنه به‌عنوان عوامل خطر در میزان ابتلا به بیماری، مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۲٤٦ نمونه خون از ورید وداجی (۱۰۳ قلاده سگ ولگرد، ۹۹ قلاده سگ نگهبان، ٤٤ قلاده سگ خانگی) گرفته شد. کنه‌ها طی بازرسی بدنی سگ‌ها جداسازی و گونه‌های آن شناسایی گردید. در بررسی ریزبینی، ۵ نمونه (۲/۰۳ درصد) از گسترش‌های خونی آلوده به *هپاتوزئون کنیس* بودند. در بررسی مولکولی، ۲۳ عدد از ۲٤٦ (۹/۳٤ درصد) نمونه خون گرفته شده آلوده به *هپاتوزئون کنیس* بودند. در این مطالعه اختلاف معنی‌داری در میزان آلودگی سگ‌های نر و ماده و در سنین مختلف دیده نشد، در حالی که میزان آلودگی در سگ‌های ولگرد نسبت به حیوانات خانگی و سگ‌های نگهبان بیشتر بود. توالی تکثیر شده ژن 18SrRNA *هپاتوزئون کنیس* در این مطالعه، در بانک اطلاعاتی ژن با شماره دسترسی MT810118 ثبت گردید. بررسیBLAST توالی‌های جدا شده از سگ‌ها در این مطالعه، موید ۱۰۰درصد شباهت توالی‌های جدا شده در این مطالعه با توالی ژنی 18S rRNA *هپاتوزئون کنیس* در بانک ژن داشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، *هپاتوزئون کنیس* در سگ‌های منطقه مورد مطالعه می تواند باعث ایجاد بیماری شود.

واژه‌های کلیدی: ارومیه، سگ، کنه، *هپاتوزئون کنیس*، PCR.

Study on *Hepatozoon canis* in dogs in Urmia region

MohammadReza Zeinali[1], Farnaz Malekifard[2*], Alaleh Rakhshanpour[3] and Mohammad Yakhchali[4]
1, 2, 4. D.V.M. Graduate, Assistant Professor and Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor, Department of Internal Diseases and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
(Received: Sep. 7, 2021 - Accepted: Oct. 6, 2021)

ABSTRACT

The aim of the present study was to detect *Hepatozoon canis* infection in dogs in Urmia municipality, northwestern Iran. The effects of age, sex, lifestyle, and tick infestation as risk factors in the incidence of the disease were studied. During years 2018 and 2019, a total of 246 whole blood samples were taken from the jugular vein of each examined dog (103 stray dogs, 99 shelter dogs, and 44 pets) and subjected to microscopic and molecular examinations. Ixodid ticks were also collected from the body surface and identified. Microscopically, infected neutrophils with *Hepatozoon* spp. were detected in 5 of 246 (2/03%) thin stained blood smears. Molecularly, 23 out of 246 (9.34%) blood samples were found to be infected with *H. canis*. There was no significant difference in different age groups and the sex of sampled dogs. However, stray dogs had a higher significant infection rate than pets and shelter ones. In body inspection, all ticks were belonging to the specie of *Rhipicephalus sanguineus*. The obtained sequence was transferred to GenBank/NCBI (samples accession numbers MT001887). BLAST analysis of obtaining sequences isolated from dogs indicated a 100% similarity with *H. canis* 18S rRNA gene sequences in GenBank. Based on our results canine hepatozoonosis was common in dogs in the study area.

Keywords: Dog, *Hepatozoon canis*, PCR, Tick, Urmia.

* Corresponding author E-mail: f.malekifard@urmia.ac.ir

مقدمه

هپاتوزئونوزیس در سگ‌ها، بیماری حاصل از یک تک‌یاخته قابل انتقال توسط کنه‌ها به نام *هپاتوزئون کنیس* می باشد. چرخه زندگی *هپاتوزئون کنیس* در سگ و در کنه‌های ناقل آن شناخته شده است (Baneth, 2011). *هپاتوزئون کنیس* لکوسیتها و بافت های پارانشیمال را درگیرکرده و انتقال آن به سگ از طریق خوردن کنه‌های حاوی اووسیست صورت می‌گیرد. کنه ی قهوه ای سگ، *ریپی سفالوس سانگوینوس*، ناقل اصلی این تک‌یاخته می‌باشد. این تک‌یاخته موجب بیماری مزمن می شود که ممکن است با علایم خفیفی همراه باشد. علایمی چون لاغری، ضعف، کاهش وزن، تب، بی اشتهایی، بزرگی غدد لنفاوی و کم خونی از جمله علایمی است که در آلودگی شدید سگ‌ها دیده می شود (Baneth, 2011).

مهمترین روش تشخیص *هپاتوزئون کنیس* بر اساس بررسی بافی کوت و گسترش خونی در سگ‌های آلوده ومشاهده گامونت‌های داخل لوکوسیت‌ها در گسترش خونی رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ می باشد، اما این روش حساسیت کمی دارد (Baneth, 2011). روش‌های سرولوژیک مانند ایمنوفلورسانت غیرمستقیم هم در تشخیص آنتی بادی در سگ‌های مبتلا به آلودگی مزمن مورد استفاده قرار گرفته است (Karagenc *et al* 2006). امروزه تشخیص بر مبنای روش‌های مولکولی، با حساسیت و ویژگی بالایی، صورت می‌گیرد. گزارش‌های مختلفی آلودگی به *هپاتوزئون کنیس* را در چهار قاره جهان گزارش نموده اند (Aktas *et al*., 2015; Allen *et al*., 2008; Karagenc *et al*., 2006).

آلودگی با *هپاتوزوئون کنیس* برای اولین بار در ایران در یک سگ نر ۱۱ ساله توسط خوش نگاه و همکاران در سال ۱۳۸۸ گزارش شد، آن‌ها توانستند گامتوسیت‌های *هپاتوزوئون کنیس را* در نوتروفیل‌های گسترش خون محیطی و گسترش مغز استخوان رنگ امیزی شده با گیمسا مشاهده نمایند (Khoshnegah *et al*., 2009). در ایران مطالعات کمی میزان آلودگی به این تک‌یاخته را با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و ریزبینی، در مناطق مختلف در مناطق مختلف گزارش نموده‌اند (Soltani & Dalimi, 2018; Barati & Razmi, 2018). با توجه به اینکه اطلاعاتی از وضعیت فراوانی آلودگی به *هپاتوزئون کنیس* در سگ‌های شهرستان ارومیه موجود نبود، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی به *هپاتوزئون کنیس* در سگ‌های شهرستان ارومیه به روش مولکولی و ریزبینی بود.

مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه

این مطالعه بر روی سگ‌های شهرستان ارومیه صورت گرفت. شهرستان ارومیه در ناحیه نیمه خشک واقع شده، و دارای متوسط بارش ۳۵۰ میلی متر می باشد. حداکثر دمای شهرستان در مرداد ماه ۲۸/۳ درجه سانتی گراد و حداقل دمای دی ماه ۵- درجه سانتی گراد می باشد. این منطقه دارای مرز مشترک با دو کشور ترکیه و عراق است (Tavassoli *et al.,* 2010).

روش نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از ۲۴۶ قلاده سگ (۱۰۳ قلاده سگ ولگرد، ۹۹ قلاده سگ نگهبان، ۴۴ قلاده سگ خانگی) به طور تصادفی انجام شد. نمونه‌گیری از سگ‌های خانگی در کلینیک دامپزشکی دانشگاه ارومیه صورت گرفت ولی نمونه‌گیری از سگ‌های دیگر توسط دامپزشک مجرب و با مقید کردن و ارام کردن حیوان انجام شد. ابتدا مشخصات هر سگ شامل سن، جنس، نحوه نگهداری سگ‌ها و آلودگی به کنه ثبت شد. سن سگ‌ها بر اساس فرمول دندانی تعیین گردید. نمونه‌های خون از ورید وداج جمع آوری و در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شدند. علاوه بر این، از هر نمونه خون، گسترش خون تهیه شد. نمونه‌ها بلافاصله در کنار یخ به آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه ارومیه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان ارزیابی مولکولی نگهداری شدند. جنس و سن و نوع سگ‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

شناسایی کنه

مواضع سطحی بدن حیوانات آلوده به کنه شامل

گوش، پشت گردن، میان دو راه، بیضه‌ها ، پستان و کشاله ران از نظر آلودگی به کنه بررسی شدند و کنه‌ها از محل چسبیدن در امتداد ضمایم دهانی جدا شده و جداگانه به میکروتیوب‌های حاوی الکل ۷۰ درصد منتقل شدند. کنه های جمع آوری شده با توجه به خصوصیات ریخت‌شناسی و بااستفاده از کلیدهای تشخیص شناسایی شدند (Estrada-Pena *et al*., 2004). فراوانی نسبی آلودگی به کنه در سگ‌ها، متوسط شدت آلودگی به کنه به ازاء هر سگ و شدت آلودگی به کنه توسط روش کاهل و همکاران انجام شد (Kahl *et al*., 2002).

بررسی ریزبینی

گسترش‌های خون تهیه شده در متانول تثبیت شد و در محلول گیمسا ۱۰ درصد در نمک بافر فسفات (PBS) با pH ۷/۲ رنگ‌آمیزی شدند. گسترش‌های خونی رنگ آمیزی شده از جهت وجود گامونت‌های هپاتوزوئون مورد بررسی قرار گرفتند. میزان پارازایتمی با شمارش تعداد نوتروفیل‌های آلوده در ۵۰ میدان ریزبینی مشخص گردید (Barati & Razmi, 2018).

روش جداسازی DNA

به منظور استخراج DNA، ۵-۱۰ گرم از نمونه خون با استفاده از نیتروژن مایع، بصورت هموژنیزه درآمده و استخراج DNA توسط کیت سیناکلون (SinapureDNA Kit) با شماره کاتالوگ EX6041، طبق دستور کارخانه سازنده انجام گرفت. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد جهت انجام PCR نگهداری شد.

روش انجام PCR جهت تشخیص *هپاتوزوئون کنیس*

جهت تکثیر قطعه حدود ۶۶۰ جفت باز از ژن 18SrRNA *هپاتوزوئون کنیس*، از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر استفاده شد (Inokuma *et al*., 2002):

Hep F
5´-ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3´
Hep R
5´-CTT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG- 3´

برای انجام PCR، کیت شرکت سیناکلون (Ready to use PCR master mix 2X) مورد استفاده قرار گرفت و طبق دستورکارخانه ی سازنده، به این صورت که برای هر نمونه ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی PCR (شامل: Taq DNA polymerase، Mgcl2، PCR buffer، dNTPs)، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای Hep F و Hep R، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده (تقریبا ۱۰ نانوگرم) و ۶/۵ میکرولیتر از آب مقطر خود کیت در لوله های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط شد. برای هر مرحله یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت هم تهیه گردید. آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد و کنترل مثبت از دانشکده دامپزشکی تهران تهیه گردید. سپس میکروتیوب‌های مخصوص PCR حدوداً ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شده تا اگر محلول در دیواره لوله باشد در ته لوله جمع شود و به دستگاه PCR منتقل شد. تکثیر قطعه ژنی *هپاتوزوئون کنیس* مورد نظر در نمونه‌ها طبق الگوی دمایی زیر انجام شد.

واسرشتی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۴ سیکل که هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها در دمای۵۷ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه توسعه در۷۲ درجه سانتی‌گراد. توسعه نهایی در مدت ۵ دقیقه ودر ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل شود (Barati & Razmi, 2018).

الکتروفورز محصول PCR

از ژل آگارز ۱/۵ درصد درالکتروفورزیس محصول نهایی PCR استفاده شد. به این منظور ۰/۶ گرم از آگارز با ۴۰ میلی‌لیتر بافر TBE (غلظت اولیه ۱۰ برابر غلظت است) مخلوط و حرارت داده شد تا جایی که مخلوط (آگارز –TBE) شفاف شود. پس از اینکه دمای ژل کمی پایین آمد و پیش از ریختن آن در کست، به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر ژل آگارز از ۱ میکرولیتر Safe stain (۱۰mg/ml) استفاده شد. ۱۰-۸ میکرولیتر از محصولات PCR به نسبت ۵ به ۱ با بافر بارگذار[1] مخلوط شده و به چاهک‌های ژل منتقل شد. به این

1. Loading buffer

ترتیب که در چاهک اول نشانگر به میزان ۵ میکرولیتر، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم و چهارم محصول PCR و درچاهک پنجم کنترل منفی ریخته شد و الکتروفورزیس در۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۵ ولت، انجام شد. بعد از زمان مذکور، ژل با دستکش به داخل UV-Transilluminator منتقل شده و با تابش اشعه ماوراء بنفش قطعات DNA مشخص گردید که مقایسه باندهای موجود در نشانگر، اندازه قطعه مورد انتظار ۶۶۰ جفت باز رؤیت شد.

تعیین توالی (Sequencing)

برای تأیید نتایج PCR، تعداد پنج نمونه مثبت جدا شده از سگ‌ها، به همراه پرایمرهای اختصاصی توسط شرکت سیناکلون ایران، تحت تعیین توالی قرار گرفتند. نتایج توالی با استفاده از نرم افزار MEGA 6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این توالی‌ها با توالی مرجع و سایر توالی‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank با استفاده از ابزار جستجوی Basic Local Alignment (BLAST) مقایسه شدند (www.ncbi.nlm.nih.gov).

ارزیابی آماری

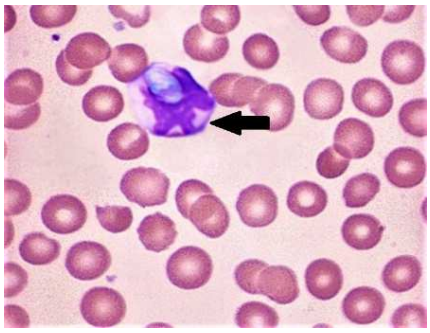
در این مطالعه رابطه میزان آلودگی سگ با توجه به عوامل خطر از جمله سن، جنس و کنه و سبک زندگی سگ‌های مورد مطالعه (نوع سگ) با استفاده از آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نظر آماری سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل نتایج با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱) انجام شد.

نتایج

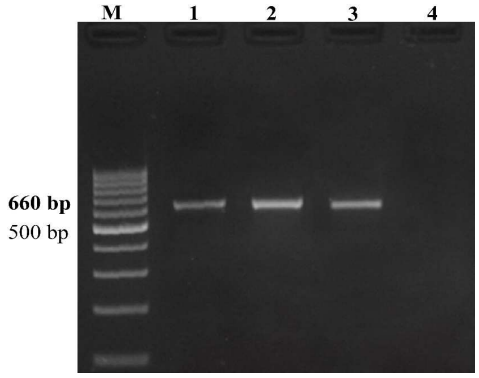
شناسایی *هپاتوزوئون کنیس* در خون سگ به روش ریزبینی و PCR

در بررسی ریزبینی از ۲۴۶ گسترش خونی، ۵ نمونه (۲/۰۳درصد) آلوده به *هپاتوزوئون کنیس* بودند. میزان پارازایتمی بین ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳ بود (شکل ۱).

نتایج روش مولکولی نشان داد که *هپاتوزوئون کنیس* در ۲۳ مورد از ۲۴۶ (۹/۳۴ درصد) نمونه خون سگ وجود داشت و قطعه مورد انتظار با اندازه۶۶۰ جفت باز از ژن 18SrRNA بعد از الکتروفورز تکثیر گردید (شکل ۲).



شکل ۱. *هپاتوزوئون کنیس* در گسترش خونی.
Figure 1. *Hepatozoon canis* in the stained blood smear



شکل ۲. تشخیص PCR *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های شهرستان ارومیه. چاهکM: نشانگر ۱۰۰جفت باز، چاهک۱: کنترل مثبت ،چاهک۲و ۳: سگ‌های آلوده به *هپاتوزوئون کنیس*، و چاهک۴: کنترل منفی.
Figure 2. PCR detection of *H. canis* in dogs of Urmia. M: 100 bp DNA marker (Fermentas); Lane1, Positive control; Lane 2 and 3, H. *canis* positive dog blood samples; Lane 4, Negative control.

عوامل مورد بررسی در شیوع هپاتوزوئون کنیس در سگ‌های مورد مطالعه

جنس و سن دام

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در میزان آلودگی به *هپاتوزئون کنیس* در سگ‌های با سنین مختلف و نیز در سگ‌های نر و ماده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵) (جدول ۱) .

نوع سگ

آنالیز آماری نتایج بیانگر تفاوت معنی‌دار در فراوانی آلودگی *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های خانگی، سگ‌های نگهبان و سگ‌های ولگرد بود (P<۰/۰۵) (جدول ۱). به طوریکه میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های ولگرد بیشتر از سگ‌های دیگر مورد مطالعه بود.

آلودگی به کنه

در بررسی ظاهری سگ‌ها، در مجموع ۱۴۱ کنه، که۵۷ مورد (۴۰/۴درصد) از آنها ماده، ۸۴ مورد (۵۹/۵درصد) نر بودند، از ۹۹ سگ جمع آوری شد. کلیه کنه‌های جدا شده، از نظر مورفولوژیکی ، *ریپی سفالوس سانگوینوس* بودند. فراوانی نسبی آلودگی به کنه در سگ‌ها ، متوسط شدت آلودگی به کنه به ازاء هر سگ و شدت آلودگی به کنه در سگ‌های آلوده به ترتیب ۴۰/۲۴ درصد ، ۰/۵۷ و ۱/۴۲ تعیین شد.

آنالیز آماری نتایج نشان داد که در میزان آلودگی *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های آلوده به کنه و غیر آلوده به کنه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۱) به طوریکه میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های آلوده به کنه بیشتر از سگ‌های غیر آلوده به کنه بود.

برای تأیید نتایج PCR مثبت به دست آمده، پنج نمونه PCR مثبت تعیین توالی شدند. در جستجوی BLAST، توالی ژن 18SrRNA گونه‌های جدا شده از سگ‌های شهرستان ارومیه، دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با توالی *هپاتوزوئون کنیس* موجود در بانک اطلاعاتی GenBank را نشان داد (شکل ۳). با توجه به مشابه بودن توالی‌های ژن 18SrRNA برای *هپاتوزوئون کنیس* جدا شده در این مطالعه، یک توالی با شماره دسترسی MT810118 در بانک اطلاعاتی GenBank، ثبت گردید.

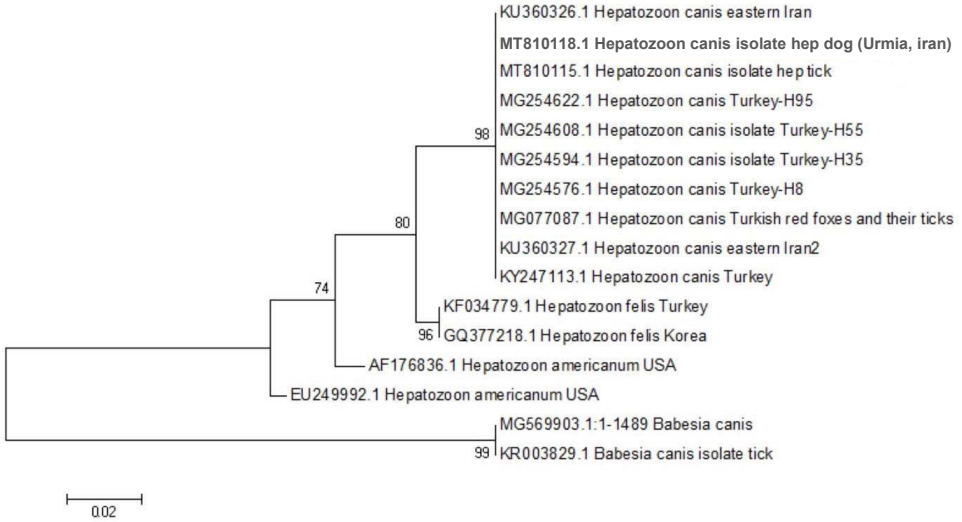
آنالیز فیلوژنتیکی

درخت فیلوژنتیکی براساس توالی ژن 18SrRNA گونه‌های جدا شده از سگ‌های شهرستان ارومیه با استفاده از روش تجزیه Maximum-likelihood (ML) ایجاد شد. براساس آنالیز فیلوژنتیک، توالی نوکلئوتیدی بدست آمده در این مطالعه، در خوشه *هپاتوزون کنیس* موجود درژن بانک بود و از *هپاتوزون امریکانوم* و *هپاتوزون فلیس* متفاوت بود.

جدول ۱. میزان آلودگی سگ‌های شهرستان ارومیه به *هپاتوزئون کنیس*

Table 1. *Hepatozoon Canis* infection in dogs from Urmia

Samples	Tick infestation status		Dog Lifestyle			Gender		Age	
	-	+	Stray	Shelter	Pet	Male	Female	≥۱	6 m to 1 yr
No Animals	147	99	99	103	44	144	78	165	81
No Infected Animals	5 (3.40)	18 (18.18)	5 (5.05)	16 (15.53)	2 (4.54)	14 (9.72)	9 (11.53)	18 (10.90)	5 (6.17)
P	X^2=15.249, P=0.000		X^2=8.005, P=0.018			X^2=0.057, P=0.811		X^2=1.438, P= 0.230	



شکل ۳. آنالیز فیلوژنتیک *هپاتوزون کنیس* جداشده از سگ‌های شهرستان ارومیه با سایر *هپاتوزئون* های موجود در بانک ژن. این آنالیز در برنامه MEGA6 صورت گرفته و *بابزیا کنیس* به عنوان خارج گروه انتخاب شد.

Figure 3. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon canis* isolates from dogs of Urmia and other isolates in GenBank. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 and *Babesia canis* was used as an outgroup.

بحث

هپاتوزوئون کنیس از مدت‌ها قبل به عنوان عامل ایجاد بیماری در سگ‌ها در سراسر جهان شناخته شده است (Baneth, 2011). در مطالعه حاضر، از گسترش خون محیطی جهت تشخیص گونه‌ی هپاتوزئون استفاده شد. *هپاتوزوئون کنیس* از نظر ریزبینی فقط در تعداد کمی از گسترش‌های خونی (۳/۲۵ درصد) از سگ‌ها تشخیص داده شد، که این می تواند به دلیل حساسیت کم روش ریزبینی نسبت به سایر روش‌های تشخیص باشد (Barati & Razmi, 2018). بر اساس بررسی ریزبینی گسترش‌های خونی، میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر بیشتر از مواردی است که در مطالعه قبلی (۱/۶ درصد) در ایران مشاهده شد (Amoli *et al*., 2012) که ممکن است به دلیل تفاوت در میزان پارازایتمی در سگ‌های مورد مطالعه باشد (Barati & Razmi, 2018).

مطالعات دیگر، با استفاده از بررسی ریزبینی گسترش خون سگ، میزان آلودگی را در ۲/۷ درصد از سگ‌های ولگرد در تایلند (Jittapalapong *et al*., 2006)، ۴/۳ درصد از سگ‌ها در کلمبیا (Vargas-Hernandez *et al*., 2012)، ۱-۱۰/۶ درصد از سگ‌های ولگرد در ترکیه (Aktas *et al*., 2015; Azmi *et al*., 2017)، ۱۱/۶ درصد از سگ‌های خانگی و بی‌خانمان در پاکستان (Qamar *et al*., 2017)، ۲۳/۷ درصد از سگ‌های شکارچی در ژاپن (El-Dakhly *et al*., 2013)، ۱۱/۳ درصد از سگ‌های روستایی در برزیل (Rubini *et al*., 2008) و ۴۳/۹ درصد از سگ‌های جوان که در یک پناهگاه واقع در ایتالیا نگهداری می شدند، را نشان دادند (Otranto *et al*., 2011).

در بررسی به روش مولکولی،۹/۳۴ درصد از سگ‌ها آلوده به *هپاتوزوئون کنیس* بودند. در مطالعه‌ای مشابه با استفاده از روش مولکولی، میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در ۸ درصد از سگ‌های شمال شرقی ایران گزارش شد (Barati & Razmi, 2018). گزارش‌های مختلفی از میزان وقوع *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های سایر کشورها وجود دارد. با استفاده از PCR ، میزان شیوع آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌ها در ایالات متحده ۰/۷ درصد (Allen *et al*., 2008) ، ۳۱/۸ درصد در کلمبیا (Vargas-Hernandez *et al*., 20)، ۲/۳-۷۹/۵۳ درصد در برزیل (Spolidorio *et al*., 2009; Rubini *et al*., 2008; De Miranda *et al*., 2014)، ۶/۸-۳/۲۵ درصد در ترکیه (Karagenc *et al*., 2016; Aktas *et al*., 2015)، ۵/۵ درصد در فلسطین (Azmi *et al*., 2017)، ۴۲/۹ درصد در ژاپن (El-Dakhly *et al*., 2013)، ۳۶ درصد در تایلند (Jittapalapong *et al*., 2006)، ۵۷/۸ درصد در ایتالیا (Otranto *et al*., 2011)، ۵۰ درصد در جمهوری چک (Mitková *et al*., 2016) و ۳۶ درصد در مجارستان (Hornok *et al*., 2013) گزارش شده است. تفاوت در میزان شیوع گزارش شده در مطالعات مختلف ممکن است تحت اثر عوامل بسیاری از جمله آب و هوا، جمعیت کنه‌های حامل و نحوه نگهداری حیوانات باشد (Barati & Razmi, 2018).

در مطالعه حاضر، تفاوت معنی‌داری در میزان آلودگی سگ‌ها به *هپاتوزئون کنیس* بین گروه‌های مختلف سنی و جنس نر و ماده مشاهده نشد. این نتایج با نتایج مطالعات دیگر انجام شده در شرق ایران (Barati & Razmi, 2018)، ترکیه (Aktas *et al*., 2015)، در ژاپن (El-Dakhly *et al*., 2013; Inokuma *et al*., 2002)، در تایلند (Jittapalapong *et al*., 2006)، در پاکستان (Qamar *et al*., 2017)، و در هند (Singh *et al*., 2017) هم‌خوانی دارد. اما نتایج مطالعات دیگر حاکی از آن بود که میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* به طور قابل توجهی با سن و جنس سگ‌ها مرتبط است (De Miranda *et al*., 2014; Aktas *et al*., 2015).

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی به کنه و میزان ابتلا به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌ها مشاهده شد. این یافته با نتایج مطالعات دیگر مبنی بر این که میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌ها با حضور کنه‌ها ارتباط مثبت دارد، سازگار است (Aktas *et al*., 2015; O'Dwyer *et al*., 2001).

براساس نتایج بدست آمده با روش PCR در این مطالعه، میزان آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های ولگرد (۱۵/۵۳ درصد) بیشتر از سگ‌های خانگی (۴/۵۴

درصد) و سگ‌های پناهگاه (۵/۰۵ درصد) بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری یافته‌های به‌دست‌آمده نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار در میزان ابتلا به *هپاتوزئون کنیس* و سبک زندگی و نحوه نگهداری سگ‌های مورد مطالعه بودکه این می‌تواند به‌علت احتمال بالای در معرض کنه بودن سگ‌های ولگرد باشد. این یافته با نتیجه مطالعه Soltani & Dalimi (2018) سازگار است.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه، اولین گزارش از آلودگی به *هپاتوزوئون کنیس* در سگ‌های شمال‌غرب ایران است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، *هپاتوزئون کنیس* می‌تواند باعث ایجاد بیماری در سگ‌های منطقه شود. همچنین با توجه به اینکه در این مطالعه آلودگی در سگ‌های ولگرد و آلوده به کنه بیشتر دیده شد، بنابراین برنامه های مبارزه با کنه‌ها توسط سازمان‌های مربوطه، در پیشگیری و کنترل بیماری در سگ‌ها باید مورد توجه قرار بگیرد. همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک برای شناسایی توزیع جغرافیایی بیماری و کنه‌های حامل هپاتوزئون، در مناطق دیگر استان آذربایجان‌غربی لازم است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Balkaya, I., Utuk, A. E., Kırbas, A., ... & Dumanlı, N. (2015). A molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in domestic dogs in Turkey. *Veterinary Parasitology*, *209*(3-4), 264-267.
2. Allen, K. E., Li, Y., Kaltenboeck, B., Johnson, E. M., Reichard, M. V., Panciera, R. J., & Little, S. E. (2008). Diversity of Hepatozoon species in naturally infected dogs in the southern United States. *Veterinary Parasitology*, *154*(3-4), 220-225.
3. Amoli, A. R., Khoshnegah, J., & Razmi, G. (2012). A preliminary parasitological survey of *Hepatozoon* spp. infection in dogs in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, *7*(4), 99.
4. Azmi, K., Al-Jawabreh, A., Nasereddin, A., Abdelkader, A., Zaid, T., Ereqat, S., ... & Abdeen, Z. (2017). Detection and molecular identification of *Hepatozoon canis* and *Babesia vogeli* from domestic dogs in Palestine. *Parasitology*, *144*(5), 613-621.
5. Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, *181*(1), 3-11.
6. Barati, A., & Razmi, G. R. (2018). A parasitologic and molecular survey of *Hepatozoon canis* infection in stray dogs in Northeastern Iran. *Journal of Parasitology*, *104*(4), 413-417.
7. De Miranda, R. L., O'Dwyer, L. H., De Castro, J. R., Metzger, B., Rubini, A. S., Mundim, A. V., ... & Baneth, G. (2014). Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, *97*(2), 325-328.
8. El-Dakhly, K. M., Goto, M., Noishiki, K., El-Nahass, E. S., Hirata, A., Sakai, H., ... & Yanai, T. (2013). Prevalence and diversity of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in Japanese islands and peninsulas. *Parasitology Research*, *112*(9), 3267-3274.
9. Estrada-Peña, A. (2004). *Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species*. University of Zaragoza.
10. Hornok, S., Tánczos, B., de Mera, I. G. F., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., & Farkas, R. (2013). High prevalence of Hepatozoon-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of Rhipicephalus sanguineus. *Veterinary Parasitology*, *196*(1-2), 189-193.
11. Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., & Onishi, T. (2002). Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, *106*(3), 265-271.
12. Jittapalapong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J. J., & Stich, R. W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Annals of The New York Academy of Sciences*, *1081*(1), 479-488.
13. Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., & Lane, R. S. (2002). Ecological research on Borrelia burgdorferi sensu lato: terminology and some methodological pitfalls. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, 29-46.
14. Karagenc, T. I., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H. B., Ozon, Y. H., ... & Eren, H. (2006). A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology*, *135*(2), 113-119.

15. Khoshnegah, J., Mohri, M., Movassaghi, A. R., & Mehrjerdi, H. K. (2009). The first report of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, *18*(4), 455-458.
16. Mitková, B., Hrazdilová, K., Steinbauer, V., D'Amico, G., Mihalca, A. D., & Modrý, D. (2016). Autochthonous Hepatozoon infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic. *Parasitology Research*, *115*(11), 4167-4171.
17. O'dwyer, L. H., Massard, C. L., & de Souza, J. C. P. (2001). *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *94*(3), 143-150.
18. Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Stanneck, D., Decaprariis, D. ... & Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors*, *4*(1), 1-6.
19. Qamar, M., Malik, M. I., Latif, M., Ain, Q. U., Aktas, M., Shaikh, R. S., & Iqbal, F. (2017). Molecular detection and prevalence of *Hepatozoon canis* in dogs from Punjab (Pakistan) and hematological profile of infected dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *17*(3), 179-184.
20. Rubini, A. S., dos Santos Paduan, K., Lopes, V. V. A., & O'Dwyer, L. H. (2008). Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo State, Brazil. *Parasitology Research*, *102*(5), 895-899.
21. Singh, K., Singh, H., Singh, N. K., Kashyap, N., Sood, N. K., & Rath, S. S. (2017). Molecular prevalence, risk factors assessment and haemato-biochemical alterations in hepatozoonosis in dogs from Punjab, India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *55*, 53-58.
22. Soltani, R., & Dalimi, A. (2018). A Molecular Study on *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Tehran (Iran). *Archives of Razi Institute*, *73*(4), 257-263.
23. Spolidorio, M. G., Labruna, M. B., Zago, A. M., Donatele, D. M., Caliari, K. M., & Yoshinari, N. H. (2009). *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, *163*(4), 357-361.
24. Tavassoli, M., Dalir-Naghadeh, B., & Esmaeili-Sani, S. (2010). Prevalence of gastrointestinal parasites in working horses. *Polish Journal of Veterinary Science,* 13(2), 319-324.
25. Vargas-Hernandez, G., André, M. R., Munhoz, T. D., Faria, J. M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from Colombia. *Parasitology Research*, *110*(1), 489-492.