بررسی شیوع *بابزیا کنیس* در سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان

سید رضا حسینی[1*]، میلاد حمزه علی طهرانی[2]، مینو پرتوی نصر[3]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۳- گروه بیولوژی مولکولی، آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی مبنا، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰، بازنگری: ۴ اردیبهشت ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

بابزیوزیس می‌تواند میزبان‌های مهره‌دار گوناگونی شامل حیوانات اهلی و وحشی و انسان را آلوده نماید. این انگل، تک‌یاخته داخل سلولی بوده که در داخل گلبول‌های قرمز خون یافت می‌شود و به‌وسیله کنه‌های خانواده ایکسودیده به میزبان‌های حساس انتقال می‌یابد. با بررسی ۲۰۰ نمونه خون اخذ شده از دو جمعیت ۱۰۰ قلاده از سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان و با استفاده از روش‌های معمول انگل‌شناسی و استفاده از روش مولکولی (PCR) جهت تایید قطعی حضور تک‌یاخته *بابزیا* در خون حیوانات مذکور اقدام شد سپس نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون مربع کای (X^2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در نمونه‌های مورد مطالعه در روش مولکولی از سگ‌های صاحب‌دار ۲۱/۱۰ درصد و ۳۹/۲۰ درصد در سگ‌های شهری مشاهده شد که با مقایسه روش مشاهده میکروسکوپیک که در سگ‌های صاحب‌دار ۱۳/۶ درصد و در سگ‌های شهری ۱۷/۹ درصد مشاهده گردید. این میزان بیانگر شیوع پایین‌تر انگل در سگ‌های صاحب‌دار نسبت به سگ‌های شهری در شهر اصفهان می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان *بابزیا کنیس* در سگ‌های بدون صاحب شهر اصفهان دارای شیوع بالاتری بوده و با توجه به توان بالقوه این سگ‌ها و وفور ناقلین بندپا در اشاعه این بیماری، این موضوع نیازمند توجه بیشتر مسئولین نسبت به جمع‌آوری و ساماندهی حیوانات شهری بیش از گذشته می‌باشد.

کلمات کلیدی: *اصفهان، بابزیا کنیس، سگ اهلی، سگ شهری، عفونت انگلی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dr.s.reza@gmail.com

مقدمه

بابزیوزیس (پیروپلاسموزیس) به‌وسیله گونه‌های مختلف *بابزیا* ایجاد می‌شود و می‌تواند میزبان‌های مهره‌دار گوناگونی شامل حیوانات اهلی و وحشی و انسان را آلوده نماید. این انگل، تک‌یاخته داخل سلولی بوده که در داخل گلبول‌های قرمز خون یافت می‌شود و به وسیله کنه‌های خانواده ایکسودیده به میزبان‌های حساس انتقال می‌یابد. از ویژگی‌های این بیماری لیز گسترده گلبول‌های قرمز است که در نهایت منجر به کم‌خونی، زردی، هموگلوبینوری و نهایتاً مرگ می‌شود. *بابزیا* در سگ‌ها نیز موجب کم‌خونی همولیتیک می‌شود. دو گونه *بابزیا کنیس* و بایزیا گیبسونی باعث آلودگی در سگ‌های اهلی و وحشی می‌گردند. *بابزیا کنیس* بر خلاف *بابزیا* گیبسونی جزء *بابزیا*های بزرگ بوده و اغلب در توله سگ‌ها ایجاد عفونت می‌کند، با توجه به شیوع قابل توجه انگل *بابزیا* در سگ‌های مورد مطالعه در ایران و نیز وجود ناقلین آن، نیاز به مطالعات مختلف برای کنترل و مبارزه با کنه جهت جلوگیری از گسترش بیماری در بین جمعیت سگ‌ها ضروری است (۸).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: جهت انجام مطالعه حاضر در طی بازه زمانی فروردین تا شهریور سال ۱۴۰۰ نسبت به نمونه گیری از سگ های اهلی مراجعه کننده به درمانگاه های دام کوچک شهر اصفهان و همچنین پناهگاه‌های نگهداری از سگ‌های بی‌سرپرست شهر اصفهان اقدام شد، تهیه نمونه با اخذ دو میلی‌لیتر از خون عروق سفالیک و نگهداری در لوله‌های ضد انعقاد واجد EDTA استریل مخصوص هماتولوژی با درج مشخصات حیوان اعم از سن و جنسیت اقدام گردید و سپس نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه مرجع جهت انجام آزمایشات انگل‌شناسی و تشخیص مولکولی ارسال گردید.

بررسی‌های مورفولوژیکی: پس از اخذ نمونه‌های ارسال شده ابتدا نسبت به تهیه گسترش نازک خون بر روی لام و رنگ‌آمیزی استاندارد با روش گیمسا اقدام شد و سپس گسترش‌های تهیه شده با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون و با کمک میکروسکوپ چشمی (Nikon YS2 - Japan) مورد بررسی قرار گرفت، مطابق با کلیدهای تشخیصی انگل‌شناسی در مورد تک‌یاخته *بابزیا کنیس*، این تک‌یاخته واجد اندازه ۵،۴ میکرون و گرد تا گلابی شکل و انگل داخل سلولی (داخل گلبول‌های قرمز خون) بوده که با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های استاندارد قابل تشخیص می‌باشد (۷، ۱۲).

استخراج DNA: برای استخراج DNA، نمونه‌های خون اخذ شده ابتدا از فریزر ۲۱- درجه سانتی‌گراد خارج شده و برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST (ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تمام DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز PCR: برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای (Forward) PIRO - A1 و (Reverse) PIRO - B که توانایی تکثیر ژنوم ریبوزومی (18 S rRNA Gene) در تک‌یاخته *بابزیا کنیس* را دارد (ثبت شده در بانک جهانی ژن) و منجر به تولید محصول PCR به طول ۴۵۰ جفت باز می‌شود استفاده شد (جدول و تصویر شماره ۱). حجم کلی محصول PCR برابر با 50 µl بوده و شامل One Time PCR Buffer ، 4 μl Genomic DNA ، 1.5 U Taq Polymerase (Ampliqon, Denmark) ، 30 pmol of each primer (Metabion, Korea) ، 100 μM of each dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Ampliqon, Denmark) و 1.5 mM MgCl2 می‌باشد (۲۰). جهت PCR نمونه‌ها از دستگاه

ترموسایکلر اتوماتیک (SimpliAmp, USA) استفاده شد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. از نمونه‌های بدون DNA ژنومی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE 0.5* آنالیز و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و در دستگاه illuminator UV مشاهده شد (۲).

Name of reactions	Name of Primer & Accession no of Corresponding gene	Nucleotide sequence (5´- 3´)	PCR product
PCR for all samples	PIRO-A1 PIRO-B	AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC TTAAATACGAATGCCCCCAAC	450 bp

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

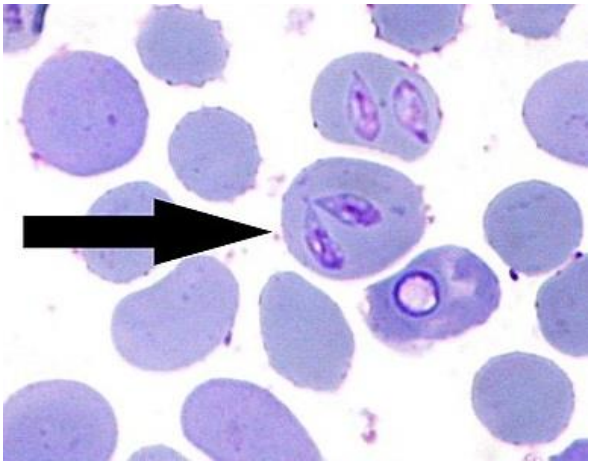
301 TTGGCCTACC GAGGCAGCAA CGGGTAACGG GGAATTAGGG TTCGATTCCG GAGAGGGAGC
361 CTGAGAGACG GCTACCACAT CTAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCCGAC
421 ACGGGGAGGT AGTGACAAGA AATAACAATA CAGGGCTAAT GTCTTGTAAT TGGAATGATG
481 GTGACTTAAA CCCTCACCAG AGTAGCAATT GGAGGGCAAG TCTGGTGCCA GCAGCCGCGG
541 TAATTCCAGC TCCAATAGCG TATATTAAAC TTGTTGCAGT TAAAAAGCTC GTAGTTGTAT
601 TTTTGCTTGG CGGTTTGTTG CCTTTGTGGC TTGATTCCGC TTGGCTTTTG GCTTTTTGCC
661 TTATTACTTT GAGAAAATTA GAGTGTTTCA AGCAGACTTT TGTCTTGAAT ACTGTAGCAT
721 GGAATAATAG AGTAGGACTT TGGTTCTATT TTGTTGGTTT GGGAACCTTG GGTAATGGTT
781 ANTAGGAACG GTTGGGGGCA TTCGTATTTA ACTGTCAGAG GTGAAATTCT TAGATTTGTT

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر برای تکثیر ناحیه 18 S rRNA Gene

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با کمک آزمون مربع کای (X^2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت، سطح معنی‌دار بودن تحقیق ($P<0.05$) بود که نشان از معنی‌دار بودن تحقیق دارد.

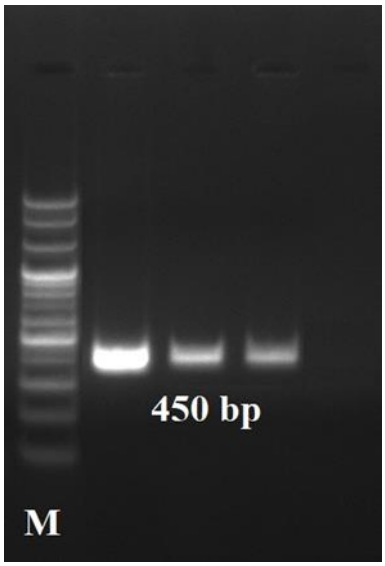
نتایج

نتایج بررسی ریخت شناسی بابزیا کنیس: نتایج بررسی شاخص‌های ریخت‌شناسی و مورفومتریک نمونه‌های اخذ شده شامل ۱۳/۶ درصد آلودگی در سگ‌های اهلی و ۱۷/۹ درصد آلودگی در سگ‌های بدون صاحب شهری مشاهده شد که بیانگر آلودگی نسبتاً پایین به این انگل با توجه به روش آزمایش (انگل‌شناسی) بود (شکل ۳).



شکل ۳- تک‌یاخته *بابزیا کنیس* داخل گلبول قرمز خون سگ

نتایج مولکولی (نتایج بررسی مولکولی DNA استخراج شده از بابزیا کنیس): اندازه قطعه تکثیر شده (18 S rRNA Gene) بعد از انجام واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده، ۴۵۰ جفت باز بوده و تمامی نمونه‌های کنترل مثبت انتخاب شده قابل تکثیر با پرایمرهای مذکور بودند. (شکل.۲).



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR

نتیجه واکنش PCR: با بررسی ۲۰۰ نمونه خون اخذ شده از دو جمعیت ۱۰۰ قلاده از سگ‌های شهری و اهلی شهر اصفهان و با استفاده از روش مولکولی (PCR) جهت تکثیر و تأیید قطعی حضور تک‌یاخته *بابزیا* در خون حیوانات مذکور اقدام شد، نتایج حاصل شده شامل ۲۱/۱۰ درصد آلودگی در سگ‌های اهلی و ۳۹/۲۰ درصد آلودگی در سگ‌های بدون صاحب شهری بود. (جدول شماره۲).

درصد آلودگی در جمعیت سگ‌ها	سگ‌های شهری	سگ‌های صاحب‌دار
روش مشاهده میکروسکوپیک	۱۳/۶	۱۷/۹
روش مولکولی	۲۱/۱	۳۹/۲

جدول ۲- درصد شیوع انگل *بابزیا کنیس* در جمعیت مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

تا به امروز روش میکروسکوپی ساده‌ترین و در دسترس‌ترین و همچنین ارزان‌ترین روش موجود در تشخیص *بابزیا* بوده است. حساسیت این روش در موارد حاد و در طول دوره پارازیتمی بسیار بالا می‌باشد ولی در موارد مزمن میزان پارازیتمی بسیار پایین بوده و یا متناوب می‌باشد که این مورد باعث مشکل در تشخیص به موقع این بیماری می شود (۴). امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی (PCR) حساسیت و ویژگی در تشخیص بسیاری از ارگانیسم‌های عفونی افزایش یافته است و می‌توان با استفاده از این ابزار به راحتی وجود یا عدم وجود بیماری را نشان داد. این روش‌ها را می‌توان در مطالعات اپیدمیولوژیک و فیلوژنی نیز به کار گرفت. در این مطالعه با استفاده از ناحیه ژنی 18 S rRNA Gene که یک ناحیه به شدت حفاظت شده است، حضور یا عدم حضور این انگل بررسی شد (۱۱). تاکنون مطالعات مختلفی در جهت بررسی مولکولی *بابزیا کنیس* در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است و وجه مشترک اکثریت غریب به اتفاق این مطالعات استفاده از ژن‌های ریبوزومی بوده است. دلیل استفاده از این ژن‌ها ثبات و حفاظت شده بودن این ناحیه ژنی است و هر نوع تفاوت در این ژن‌ها را می‌توان به منزله تفاوت تبارشناسی در نظر گرفت، وجه مشترک تمامی این مطالعات میزان شیوع کم این انگل می‌باشد. تفاوت میان میزان شیوع در شهرهای مختلف می‌تواند به دلیل فاکتورهای اپیدمیولوژیک باشد. مهم‌ترین فاکتور در این زمینه توزیع جغرافیایی کنه‌های ناقل می‌باشد که با توجه به شرایط اقلیمی متفاوت در ایران، تفاوت در میزان شیوع امری طبیعی می‌باشد. در مطالعه راضی جلالی و همکاران (۲۰۱۳) با عنوان بررسی عفونت *بابزیا* در سگ‌های شهری و روستایی شهرستان اهواز، با مطالعه ۲۰۰ قلاده سگ شهری ۳/۷۵ درصد و در سگ‌های روستایی ۵/۵ درصد آلودگی به *بابزیا کنیس* گزارش شده بود (۱۳). در مطالعه اختردانش و همکاران (۲۰۱۶) تحت عنوان تشخیص مولکولی گونه‌های *بابزیا* در سگ‌های آلوده به کنه در جنوب شرقی ایران از مجموع ۲۸۴ سگ مورد بررسی شیوع مولکولی ۵ درصد گزارش شده است (۱). در مطالعه Iatta و همکاران (۲۰۲۱) با هدف مطالعه پاتوژن‌های ناقل در سگ‌های مناطق مختلف ایران و پاکستان، از مجموع ۴۰۳ سگ مورد بررسی تنها ۱ درصد آلودگی به این انگل در مناطق بررسی شده گزارش گردیده است (۹). در مطالعه حبیبی و همکاران (۲۰۱۹) تحت عنوان شناسایی خصوصیات مولکولی *بابزیا کنیس وجلی* و *تیلریا آنولاتا* در سگ‌ها و کنه‌های آزاد شهرستان شهریار استان تهران، ۲۵ درصد آلودگی به *بابزیا کنیس* وجلی در کنه‌های جمع‌آوری شده در منطقه مذکور مشاهده شده است (۶). در مطالعه دلیمی و همکاران (۲۰۱۹) با عنوان بررسی مولکولی لیشمانیوز احشایی و بابزیوز در سگ‌های اهلی مشکین شهر استان اردبیل از مجموع ۱۴۸ سگ مورد بررسی هیچ‌گونه آلودگی گزارش نشده است (۳). در مطالعه خان‌محمد و همکاران (۲۰۲۱) با عنوان شناسایی

مولکولی و تعیین ژنوتیپ *بابزیا کنیس* در سگ‌های شهرستان مشکین شهر، شمال غرب ایران، از مجموع ۴۳ نمونه مورد بررسی شیوع ۹/۳ درصد به تک‌یاخته *بابزیا کنیس* دیده شده است (۱۰). در مطالعه قاسم‌زاده و همکاران (۲۰۲۲) تحت عنوان شناسایی مولکولی ژنوتیپ A در *بابزیا کنیس* یک سگ، توانستند در نمونه‌های مورد بررسی جدایه ژنوتیپ A *بابزیا کنیس* را با کمک ژنوتایپینگ توصیف نمایند (۵). در مطالعه Badwi و همکاران (۲۰۲۰) تحت عنوان شناسایی مولکولی *بابزیا کنیس* در سگ‌های استان بغداد کشور عراق، با بررسی ۳۱۰ سگ مورد بررسی شیوع ۵/۱ درصد گزارش گردید (۲). در مطالعه حاضر میزان شیوع انگل در سگ‌های اهلی ۲۱/۱۰ درصد و در سگ‌های بدون صاحب شهری ۳۹/۲۰ درصد تعیین گردید که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول شماره ۲) که دلیل اصلی و عمده درمان ضد انگل‌های خارجی به صورت دوره‌ای در سگ‌های اهلی و عدم ارتباط آنها با سگ‌های بدون صاحب و سایر سگ‌های اهلی می‌باشد هرچند قرار گرفتن سگ‌ها در محیط‌هایی از قبیل پارک‌ها که سگ‌های ولگرد و یا سگ‌های صاحب‌دار دیگر در آن رفت و آمد دارند، احتمال آلودگی را افزایش می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان *بابزیا کنیس* در سگ‌های بدون صاحب شهر اصفهان دارای شیوع بالاتری بوده و با توجه به توان بالقوه این سگ‌ها و وفور ناقلین بندپا در اشاعه این بیماری، این موضوع نیازمند توجه بیشتر مسئولین نسبت به جمع‌آوری و ساماندهی حیوانات شهری بیش از گذشته می‌باشد.

References

1- Akhtardaneshi B, Saberi M, Nurollahifard SR, Aghazamani M. Molecular Detection of *Babesia* spp. In Tick Infested Dogs in Southeastern Iran. *Journal of Disease and Global Health*. 2016; 8(2): 72-77. [In Persian]

2- Badawi NM, Yousif AA. *Babesia canis* spp. in dogs in Baghdad Province, Iraq: First molecular identification and clinical and epidemiological study. *Veterinary World*. 2020; 13(3): 579-585.

3- Dalimi AH, Mohammadiha A, Mohammadnajjar M. A Molecular Study on Visceral Leishmaniasis and Babesiosis in Domestic Dogs of Meshkinshahr, Ardabil Province. *Pathobiology Research*. 2019; 22(2):91-95.

4- Fathipour V, Esmaeilnejad B, Habibi Gh, Afshari A, Tavassoli M, Asri Rezaei S, *et al.* *Babesia canis* caused clinical babesiosis in a female Shih Tzu dog. Veterinary Research Forum. 2021; 12 (4) 519-522. [In Persian]

5- Ghasemzade M, Esmaeilnejad B, Asri Rezaei S, Hadian M. Molecular identification of *Babesia canis canis* genotype A in a dog from Iran. *VetMed Sci*. 2022; 8:21-25. [In Persian]

6- Habibi Gh, Imani A, Afshari A, Bozorgi S. Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* and *Theileria annulata* in Free-Ranging Dogs and Ticks from Shahriar County, Tehran Province, Iran. *Iran J Parasitol*. 2019; 15(3): 321-331. [In Persian]

7- Hashempoor F. Principles and Methods of Laboratory Veterinary Parasitology. *Lorestan: Marz Danesh Press*. 2015: 33-43.

8- Heidari H, Sadeghi MR, Gharekhani J. Parasitology & Veterinary Parasitic Disease. *Hamedan: University of Bo-Ali Sina Press*. 2009: 159-160.

9- Iatta R, Sazmand A, Nguyen V, Nemati F, Mazhar Ayaz M, Bahiraei Z, *et al.* Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. *Parasitology Research*. 2021; 120: 4219-4228.

10- Khanmohammad M, Zolfaghari Emameh R, Arshadi M, Razmjou E, Karimi P. Molecular Identification and Genotyping of *Babesia canis* in Dogs from Meshkin Shahr County, Northwestern Iran. *J Arthropod-Borne Dis*. 2021; 15(1): 97-107. [In Persian]

11- Panait, L.C., Hrazdilová, K., Ionicˇa, A.M., Deak, G., Chi samera, G.B., Adam, C, *et al.* *Babesia pisicii* n. sp. And *Babesia canis* Infect European Wild Cats, Felis silvestris, in Romania. *Microorganisms*. 2021; 9(7): 1474.

12- Razavi M, Rajabloo M, Shayegh H. Veterinary Clinical Parasitology. 8th ed. Shiraz: *University of Shiraz Press.* 2016: 1-52.

13- Razi jalali MH, Mosallanejad B, Avizeh R, Alborzi AR, Hamidi Nejat H, Taghipour R. *Babesia* infection in urban and rural dogs in Ahvaz district, Southwest of Iran. *Archives of Razi Institute*. 2013; 68(1): 37-42. [In Persian]

Prevalence of *Babesia canis* in urban and domestic dogs in Isfahan

Seyed Reza Hosseini[1*], Milad HamzehAli Tehrani[2], Minoo Partovi Nasr[3]

1- Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2- Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Department of Molecular Biology, Mabna Veterinary Laboratory, Karaj, Iran.

Receive: March 9, 2022; Revise: April 24, 2022; Accept: May 21, 2022

Summary

Babesiosis is caused by different species of babesiosis. It can infect a variety of vertebrate hosts, including domestic and wild animals and humans. The parasite is an intracellular monocyte found inside red blood cells. It is transmitted to sensitive hosts by ticks in the oxidized family. This disease is characterized by extensive lysis of red blood cells, which leads to anemia, jaundice, hemoglobinuria, and eventually death. In this work, 200 blood samples were examined. Samples were taken from two populations of 100 urban and domestic dogs in Isfahan using common parasitological methods and molecular method (PCR) to amplify and confirm the presence of *Babesia* protozoa in the blood of these animals. The results were then statistically analyzed using SPSS software V.16 and the chi-square test (X2). In the samples obtained from pet dogs, a molecular prevalence of 21/10% was observed in urban dogs compared to 39/20%. It was reported by comparing the observational method of parasitology 13/6% and 17/9%, in domestic and urban dogs, respectively. This indicates the low prevalence of this parasite in domestic dogs compared to the urban dogs in Isfahan. The results of the present study showed that *Babesia canis* has a higher prevalence in stray dogs in Isfahan. Considering the potential of these dogs and the abundance of arthropod carriers in the spread of this disease, this issue should be further considered by officials to collect and organize the dogs. The number of urban animals is increasing more than ever.

Key words: *Babesia canis, Domestic Dog, Isfahan, Parasitic Infection, Urban Dog*