



تشخیص مولکولی اریلیشیا کنیس در سگ‌های نگهبان شهر اصفهان، ایران

سید رضا حسینی^۱، میلاد حمزه علی طهرانی^{۲*}

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران.



*نویسنده مسئول: dr.miladth.vetparasito@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

چکیده

اریلیشوز مونوسیتیک سگ (CME) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی سگ‌های اهلی و ولگرد بوده که توسط باکتری‌های درون سلولی گرم منفی ایجاد و مونوسیت‌ها را آلوده می‌کند. سگ‌ها مخزن اصلی و کنه ریپی سفالوس سنگوئینوس (*Rhipicephalus sanguineus*) ناقل بندپا این بیماری است. این بیماری واجد پراکندگی جغرافیایی جهانی بوده، اما اطلاعات کمی در مورد میزان درصد آلودگی به اریلیشوز مونوسیتیک سگ (CME) در ایران وجود دارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی حضور اریلیشیا کنیس (*Ehrlichia Canis*) در سگ‌های نگهبان در شهر اصفهان انجام شد. ۱۱۰ نمونه خون از سگ‌های نگهبان در نواحی شهر اصفهان با میانگین سنی ۳/۵ سال به‌طور تصادفی انتخاب و به روش اسمیر مستقیم خون و روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. ۱۳ نمونه (۱۲/۱۴ درصد) از نظر مولکولی مثبت شد که شامل هفت سگ نر (۵۳/۸۴ درصد) و شش سگ ماده (۴۶/۱۵ درصد) بود. تغییرات هماتولوژیک در نمونه‌های آلوده قابل تشخیص نبود. در بررسی درصد آلودگی به اریلیشیا کنیس با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۴، بین گروه‌های سنی مورد آزمایش تفاوت معنی داری ($p < 0.05$) مشاهده نشد. نتایج نشان دهنده شیوع بیماری در سگ‌های نگهبان شهر اصفهان بوده و با توجه به اینکه برخی از گونه‌های اریلیشوز به عنوان زئونوزهای بالقوه مطرح هستند بنابراین، نقش سگ‌های آلوده به عنوان منابع بالقوه عفونت برای انسان، به دلیل جنبه‌های مشترک بین انسان و دام حائز اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اریلیشیا کنیس، سگ‌های آلوده، PCR، اصفهان.

مقدمه

بیماری ارلیشیوز از مهم ترین بیماری های عفونی در سگ ها بوده و توسط باکتری درون سلولی گرم منفی ایجاد و مونوسیت ها را آلوده می نماید، سگ ها به عنوان مخزن پیشنهادی این آلودگی مطرح بوده و انتقال این جرم بیماری را از طریق کنه ها انجام می شود و همچنین سگ های آلوده می توانند سال ها ناقل تحت بالینی باقی بمانند و چنین سگ هایی ممکن است به مناطق غیر آندمیک منتقل شوند و متعاقباً ماه ها یا سال ها بعد به این بیماری مبتلا شوند (۱). این انگل اولین بار در سال ۱۹۳۵ در الجزایر تشخیص داده شد و متعاقباً از جنوب هند، آفریقا، سنگاپور و مالزی گزارش شده و به عنوان عامل ایجاد کم خونی استوایی سگ در سگ های نظامی ایالات متحده مستقر در ویتنام شناسایی شده است و آلودگی به /ارلیشیا کنیس از آن زمان در سگ های مناطق معتدل از جمله آمریکای مرکزی و جنوبی، آفریقا، جنوب اروپا و آسیای جنوب شرقی گزارش شده است و علاوه بر این، /ارلیشیا کنیس به عنوان یک عامل انگلی بیماری زای مشترک بین انسان و دام شناخته شده است و انتقال این بیماری نیاز به حضور کنه ریپیسفالوس سنگوئینوس دارد و میزبان مهره دار برای /ارلیشیا کنیس شامل اعضای خانواده سگ سانان شامل: کاپوت، روباه و شغال، علاوه بر سگ خانگی، میزبان مخزن محسوب می شوند. اکثر موارد آلودگی در طول فصل گرم رخ می دهد که کنه های ناقل این بیماری فراوان هستند ولی با این حال، این بیماری ممکن است در تمام طول سال در نتیجه دوره تحت بالینی طولانی مدت در حیوانات مبتلا به شکل مزمن رخ دهد (۱). دوره کمون بیماری ۸ تا ۲۰ روز بوده و ارگانیسم ها در داخل سیتوپلاسم مونوسیت ها و ماکروفاژها تحت عنوان مورولا و به روش تقسیم دوتایی تکثیر شده و در سراسر بدن پخش می گردد. دوره کمون با سه مرحله متوالی دنبال شده که به شکل حاد، تحت بالینی و مزمن رخ می دهد، مرحله حاد ممکن است ۱ تا ۴ هفته طول بکشد. ارلیشیوز مونوسیتیک سگ می تواند با علائم بالینی از جمله تب، بی اشتها، لنگش و کم خونی ظاهر شود. اگرچه این علائم غیر اختصاصی بوده و عفونت می تواند بدون هیچ علامت بالینی رخ دهد. ناهنجاری های هماتولوژیک می تواند شامل لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هیپرپروتئینمی و هیپرگلوبولینمی باشد، اما رابطه مستقیم بین این یافته های آزمایشگاهی و مثبت بودن سرمی مورد بحث است (۱).

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

این مطالعه با تهیه نمونه خون از ۱۱۰ قلاده سگ نگهدارنده به ظاهر سالم در طی بازه زمانی فروردین تا شهریور ۱۴۰۱ که عمدتاً در دامداری های شهر اصفهان نگهداری می شدند، انجام شد. این سگ ها شامل ۶۱ سگ نر و ۴۹ سگ ماده با میانگین سنی ۳/۵ سال بودند. هر حیوان به طور کامل مورد معاینه بالینی قرار گرفت و پرسشنامه های دقیق در مورد سابقه هر گونه بیماری در آن حیوان تکمیل شد. نمونه گیری با اخذ پنج میلی لیتر خون از ورید سفالیک هر حیوان انجام و هر نمونه به دو بخش تقسیم شد و پس از تهیه گسترش خونی، خشک شدن، فیکس کردن با متانول و رنگ آمیزی با رنگ گیمسا (مرک، آلمان)، شمارش کامل سلول های خون به صورت دستی برای همه سگ ها انجام شد و احتمال وجود اختلالات خونی مانند کم خونی (هماتوکریت <۳۷)، لکوپنی (<۶۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر خون) و ترومبوسیتوپنی (>۲۰۰۰۰ پلاکت در میکرولیتر خون) ثبت شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، نمونه های خون اخذ شده ابتدا از فریزر ۲۱- درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد نگهداری شد.



مجله بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان

واکنش PCR:

برای واکنش PCR از پرایمرهای EC1 (Forward) و EC2 (Reverse) که توانایی تکثیر ژنوم ریبوزومی (18 S rRNA Gene) در تک یاخته /ریشیا کنیس را دارد (ثبت شده در بانک جهانی ژن به شماره دسترسی (M73221) و منجر به تولید محصول PCR به طول ۴۹۵ جفت باز می شود استفاده شد (جدول ۱) (۲). حجم کلی محصول PCR برابر با 50 µl بوده و شامل One PCR Buffer، 4 µl genomic DNA، 1.5 U Taq polymerase (Ampliqon, Denmark)، 30 pmol of each primer، 100 µM of each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Ampliqon, Denmark)، (Metabion, Korea) می باشد. جهت PCR نمونه ها از دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (SimpliAmp, USA) استفاده شد. برنامه PCR جهت تکثیر ژن واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه انجام گردید. از نمونه های بدون DNA ژنومی به عنوان کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1X TBE آنالیز و یا استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه UV illuminator مشاهده شد.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ناحیه 18 SrRNA Gene

Reactions	Name of primer (accession number of the corresponding gene)	Nucleotide sequence (5'–3')	PCR product
PCR for all samples	EC1 (M73221)	TTATAGCCTCTGGCTATAGG	495 bp
	EC2 (M73221)	CACTTTTAACTTACTAGTCC	

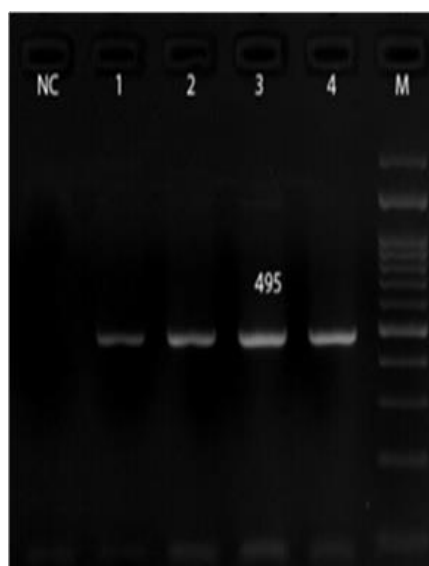
تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل نتایج و مقادیر درصد آلودگی بر اساس سن و جنس با استفاده از آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر انجام شد و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴؛ SPSS Inc., Chicago, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ($p < 0.05$).

نتایج

نتایج مولکولی

اندازه قطعه تکثیر شده (18 S rRNA Gene) بعد از انجام واکنش PCR با پرایمرهای ذکر شده، ۴۹۵ جفت باز بوده و از یک نمونه تعیین توالی شده به عنوان کنترل مثبت آزمایش استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR

چاهک اول کنترل منفی، چاهک اول کنترل مثبت، چاهک دوم تا چهارم نمونه های مورد آزمایش که با پرایمر استفاده شده قابل تکثیر بوده و آلودگی مثبت تلقی می گردند، طول مارکر استفاده شده برابر با 100bp می باشد. نتایج بررسی گسترش خونی در تمامی ۱۱۰ مورد نمونه بررسی شده در این تحقیق هیچگونه شواهدی مبنی بر وجود مورولا در لنفوسیت های خونی دیده نشد. نتایج تابلو خونی

با بررسی تابلو خونی سگ های مورد مطالعه، از ۱۱۰ قلاده سگ مورد آزمایش، هفت قلاده برابر با ۶/۵۴ درصد، وجود اختلالات خونی مانند کم خونی (هماتوکریت > ۳۷)، لکوپنی (> ۶۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر خون) و ترومبوسیتوپنی (> ۲۰۰۰۰۰ پلاکت در میکرولیتر خون) مشاهده شد که در سه قلاده لکوپنی به مراتب بسیار پایین تر از چهار قلاده دیگر مشاهده شد.

آنالیز آماری

میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه سه سال و نیم بوده است که ۵۷ درصد جمعیت کمتر از سه سال و ۴۳ درصد مسن تر بودند. هفت قلاده سگ برابر با ۶/۵۴ درصد کم خون (هماتوکریت > ۳۷.۰۰ درصد) و سیزده نمونه برابر با ۱۲/۱۴ درصد از ۱۱۰ نمونه مورد بررسی با استفاده از روش مولکولی آلوده به انگل بوده اند. با این حال، در اسمیرخونی رنگ آمیزی شده، هیچ شواهدی مبنی بر وجود مورولا مشاهده نشد. درصد آلودگی به اریشیوز در سگ های جنس نر برابر با ۵۳/۸۴ درصد نسبت به سگ های جنس ماده با ۴۶/۱۵ درصد بیشتر بوده و تمامی موارد اریشیوز مثبت مربوط به سگ هایی با نژاد بومی و مسن تر از یک سال بوده است.

بحث

بیماری ناشی از گونه های اریشیا به عنوان یک بیماری زئونوز واجد اهمیت خاص جهانی می باشد در بسیاری از کشورها بوده و اگرچه این انگل عمدتاً از طریق گزش کنه های آلوده از جمله آمبلیوما آمریکانوس (*Amblyomma americanum*) / ایکسودس اسکاپولاریس (*Ixodes scapularis*) و ریپیسفالوس سنگوئینوس به انسان و حیوانات منتقل می شود ولی با توجه به پراکندگی



مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

جهانی کنه‌های سخت ذکر شده و نگهداری از سگ‌ها به عنوان حیوانات خانگی این موضوع در بسیاری از کشورها حائز اهمیت بوده و انتقال آلودگی و بروز علائم آن وابسته به سن و جنس و نژاد نمی‌باشد. اگرچه در گذشته شناسایی عامل این بیماری از طریق میکروسکوپی و بررسی تابلو خونی صورت می‌گرفت ولیکن طبق مطالعات انجام شده روش‌های دیگری همچون Nested PCR و ایمنی شناسی دارای حساسیت بسیار بالاتری در تشخیص آلودگی می‌باشد.

در مطالعه خووند و همکاران در سال ۲۰۲۲، با عنوان جداسازی گونه‌های *ارلیشیا* در کنه‌های جمع آوری شده از سگ‌های ولگرد در مرکز و جنوب شرق ایران، از مجموع ۹۲ نمونه مورد بررسی به روش مولکولی، در هر دو منطقه (اصفهان و زابل) ۱۵/۲۱ درصد مثبت که ۲۱/۴۲ درصد و ۱۰ درصد موارد به ترتیب مربوط به استان اصفهان و زابل بوده اند (۳).

در مطالعه Vinay M Ratnalikar و همکاران در سال ۲۰۲۲، با عنوان یافته‌های بالینی و تغییرات بیوشیمیایی هماتولوژی در سگ‌های مبتلا به *ارلیشیا کنیس*، از مجموع ۱۲۴ قلاده سگ مورد مطالعه با علائم بالینی ارجاع شده به کلینیک دانشگاه علوم دامپزشکی Rajendranagar کشور هند، ۴/۰۳، ۸۷/۵ و ۹۶/۷۷ درصد به ترتیب در اسمیر خون محیطی، کیت تست سریع آنتی ژنی و روش Nested PCR مثبت گزارش شده اند (۴).

در مطالعه Asmaa A. Hegab و همکاران در سال ۲۰۲۲، با هدف غربالگری و شناسایی فیلوژنتیک پاتوژن‌های منتقله از کنه در جمعیت سگ‌ها و کنه‌های مرتبط در مصر، از مجموع ۲۰۸ نمونه خون جمع آوری شده از بین گروه‌های سنی و نژادی مختلف، تمامی کنه‌های جمع آوری شده ریپسفالوس سنگوئینوس بوده اند که با بررسی مولکولی آن‌ها، ۲۳/۵۶ درصد آلودگی به *آناپلاسما* و ۱۱/۱ درصد آلودگی به *ارلیشیا کنیس* و ۸/۲ درصد آلودگی به *بابزیا کنیس* گزارش گردیده است (۵).

در مطالعه Burçak Aslan Çelik و همکاران در سال ۲۰۲۲، تحت عنوان بررسی مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های منطقه سیرت کشور ترکیه انجام شده بود، با بررسی ۸۲ قلاده سگ مورد مطالعه به روش مولکولی شیوعی برابر با ۲۴/۱۷ درصد (۱۰/۵۳ درصد جنس نر و ۱۳/۶۴ درصد در جنس ماده) گزارش شده است (۶).

در مطالعه Mohammed Badawi و همکاران در سال ۲۰۲۲، تحت عنوان اولین تشخیص مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های بغداد کشور عراق انجام شده بود از مجموع ۲۰۰ قلاده سگ مورد مطالعه، ۳/۵ درصد به روش میکروسکوپی و ۲۶ مورد مثبت به روش مولکولی گزارش گردیده است (۷).

در مطالعه Roberta latta و همکاران در سال ۲۰۲۱، تحت عنوان بررسی پاتوژن‌های منتقل شده از طریق ناقلین در سگ‌های مناطق مختلف ایران و پاکستان و با بررسی به روش مولکولی و ایمنوفلورسانس، از مجموع ۴۰۳ قلاده سگ مورد مطالعه ۴۶/۹ درصد آلودگی به *هیپاتوزون کنیس*، ۴۱/۴ درصد *آناپلاسما پلاتیس*، ۳/۴ درصد *ارلیشیا کنیس*، ۲/۲ درصد گونه‌های ریکتزیا، یک درصد *بابزیا وجلی*، ۰/۳ درصد *لیشمانیا اینفانتوم* و شیوع سریعی علیه آنتی ژن *لیشمانیا اینفانتوم* ۹/۶ درصد گزارش شده است (۸).

در مطالعه چوبدار و همکاران در سال ۲۰۲۱، با عنوان بررسی کنه‌های هیالوما و ارتباط آن‌ها با گونه‌های *آناپلاسما* و *ارلیشیا* در مرز ایران و پاکستان، از مجموع ۱۰۲۰ کنه جمع آوری شده شایع ترین گونه *هیالوما آناپلازیکوم* بوده است که در بررسی مولکولی صورت گرفته ۹/۱ درصد آلوده به *E.ewingii* گزارش گردیده است (۹).

در مطالعه Ayan و همکاران در سال ۲۰۲۰، که تحت عنوان بررسی شیوع بالای *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های شهر وان کشور ترکیه انجام شده بود، از مجموع ۳۸۷ نمونه خون بررسی شده به روش مولکولی ۷۹ نمونه مثبت گزارش شده است (۱۰).

در مطالعه Eva Ajaj و همکاران در سال ۲۰۲۰، با هدف بررسی شیوع سرمی ارلیشیوز در سگ های ولگرد استان نینوا کشور عراق، با بررسی ۸۸ نمونه خون اخذ شده و مطالعه به روش الایزا غیر مستقیم، ۱۰/۲ درصد شیوع سرمی گزارش گردیده و همچنین هیچ ارتباط معنی داری بین سن و جنس با شدت عفونت مشاهده نشده است (۱۱).

در مطالعه بهاریه یزدی و همکاران در سال ۲۰۱۸، با عنوان شیوع سرمی و عوامل خطر ارلیشیوز سگ سانان در سگ های شهری و روستایی اهواز، از ۱۸۴ قلاده سگ مورد مطالعه، ۳۰/۹۸ درصد به روش الایزا و صفر درصد به روش بررسی گسترش خونی مثبت بوده اند (۱۲).

در مطالعه جعفر بیکلو و همکاران در سال ۲۰۱۸، تحت عنوان بررسی خصوصیات مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی گونه های *آنپلازما* و *ارلیشیا* جدا شده از کنه های مختلف در مناطق جنوب شرقی و شمال غرب ایران، از مجموع ۹۳۰ کنه جمع آوری شده، در ۱۴ کنه جمع آوری شده از منطقه هریس، شامل پنج کنه *درماستور مارچیناتوس*، یک کنه *همافیزالیس اریاسه*، سه کنه *هیالوما آناتولیکوم* و چهار کنه *ریپیسفالوس سنگوئینوس* و چهار کنه *هیالوما درومدری* شناسایی شده است، همچنین تجزیه و تحلیل مولکولی از توالی ژن 16 S rRNA نمونه های مثبت کنه های جمع آوری شده نشان داد که آنها به میزان ۹۱ تا ۹۶ درصد به *نئوارلیشیا* و گونه های *ارلیشیا* آلوده بوده اند (۱۳).

در مطالعه بیگدلی و نام آوری در سال ۲۰۱۷، تحت عنوان ارزیابی روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در تشخیص ارلیشیوز و بابزیوز سگ، مطالعه بر روی سگ های گله و ولگرد در شیراز، از مجموع ۲۸۰ قلاده سگ ولگرد و گله مورد آزمایش چهار قلاده سگ گله آلوده به *ارلیشیا کنیس* و یک سگ گله آلوده به *بابزیا کنیس* بوده است (۱۴).

در مطالعه متقی پیشه و همکاران در سال ۲۰۱۶، تحت عنوان ارزیابی ارلیشیوز در سگ های خانگی و کنه های انگلی آنها در شهر کرمان انجام شده بود، از مجموع ۱۰۰ کنه *ریپیسفالوس سنگوئینوس* جداسازی شده از سگ های خانگی، ۶ درصد کنه های تحت آزمون از نظر مولکولی مثبت، و نه درصد نمونه خون اخذ شده از سگ ها نیز آلودگی به ارلیشیوز را نشان داده بودند، همچنین با بررسی ۶۷ نمونه خون تهیه شده از صاحبین سگ های مورد آزمایش، هیچگونه آلودگی در بین صاحبین آنها مشاهده نشده است (۱۵).

در مطالعه درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۶، با عنوان تشخیص مولکولی گونه های *ارلیشیا* در نمونه خون سگ های جنوب ایران، با بررسی ۹۸ قلاده سگ مورد مطالعه، ۳/۰۶ درصد آلودگی مثبت گزارش گردیده است و بین پارامترهای خونی و میزان شیوع هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشده است (۱۶).

در مطالعه تاجدین و همکاران در سال ۲۰۱۶، با هدف بررسی عفونت بالای گونه های *آنپلازما* و *ارلیشیا* در میان گونه های کنه جمع آوری شده از نقاط مختلف جغرافیایی ایران انجام شده بود، از مجموع ۳۸۴ نمونه کنه جمع آوری شده از چهار استان آذربایجان شرقی، گیلان، خراسان جنوبی و یزد، کنه *ریپیسفالوس سنگوئینوس* با شیوعی برابر با ۲/۳ درصد داشته است، همچنین شیوع عفونت به *ارلیشیا* و *آنپلازما* نیز برابر با ۵۵/۵ درصد گزارش شده است (۱۷).

در مطالعه انصاری و همکاران در سال ۲۰۱۵، تحت عنوان شیوع سرمی و بررسی عوامل خطر عفونت به *ارلیشیا کنیس* در میان سگ های خانگی مشهد، شمال شرق ایران؛ با بررسی ۲۵۰ قلاده سگ مورد مطالعه به روش ایمونوفلورسانس (IFA) در ۰/۸ درصد سگ های مورد مطالعه گزارش شده است که این میزان می تواند به علت کمتر بودن میزان آلودگی به کنه در سگ های خانگی باشد (۱۸).



مجله بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان

در مطالعه جعفریکلو و همکاران در سال ۲۰۱۴، با عنوان تشخیص مولکولی عفونت *آنپلاسما* و *ارلیشیا* در کنه ها در مرز ایران و افغانستان، با بررسی مولکولی ۵۳ نمونه از کنه های جمع آوری شده از شهرستان های زابل و زهک در استان سیستان و بلوچستان هم مرز با کشور افغانستان، ۲۶/۴ درصد آلودگی همزمان با *ارلیشیا* و *آنپلاسما* را در کنه های *رپیسفالوس* سنگوئینوس مورد مطالعه بوده است (۱۹).

در مطالعه معاذی و همکاران در سال ۲۰۱۳ با عنوان مطالعه مولکولی آلودگی به *ارلیشیا کنیس* در سگ های ترومبوسیتوپنیک، از مجموع ۴۰ نمونه خون جمع آوری شده از سگ های ارجاع شده به بیمارستان آموزشی دام های کوچک دانشگاه تهران، با استفاده از روش Nested PCR در مجموع یک سوم از سگ های ترومبوسیتوپنیک واجد آلودگی به *ارلیشیا کنیس* بوده اند (۲۰). در مطالعه خازنی و همکاران در سال ۲۰۱۳، تحت عنوان تشخیص مولکولی *ارلیشیا کنیس* در جمعیت کنه های جمع آوری شده روی سگ های مشکین شهر، استان اردبیل؛ با بررسی ۱۴۶ کنه مورد مطالعه، ۲۹/۴۴ درصد جنس ماده و ۴۷/۹۴ درصد جنس نر بوده اند و *رپیسفالوس* سنگوئینوس شایع ترین کنه یافت شده بوده است و در ۴۳/۸۴ درصد موارد آلودگی کنه ها به *آنپلاسما* و گونه های *ارلیشیا* به روش Nested PCR گزارش شده است (۲۱).

در مطالعه آویژه و همکاران در سال ۲۰۱۰، با هدف شیوع سرمی *ارلیشیا کنیس* در سگ های ارجاع شده به بیمارستان دام پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، با بررسی ۱۹۸ نمونه آنتی بادی سرم خون به روش ایمونوکروماتوگرافی، ۹/۶ درصد واجد آنتی بادی علیه *ارلیشیا کنیس* بوده اند که از نظر شیوع، ۱۶/۱۸ درصد در سگ های بالای سه سال، ۱۱/۸۶ درصد و ۱/۴۱ درصد مربوط به سگ های کمتر از یک سال سن بوده است و تنها در ۲/۰۲ درصد نمونه های مورد بررسی مورولا دیده شده است. در مورد شاخص ترومبوسیتوپنیک و شیوع سرمی مثبت، ۲۰/۸۳ درصد واجد علائم ترومبوسیتوپنیک و ۸/۰۵ درصد فاقد علائم بوده اند (۲۲). در مطالعه اختر دانش و همکاران در سال ۲۰۱۰، با هدف بررسی شیوع سرمی و عوامل مرتبط با پاسخ مثبت آنتی بادی به *ارلیشیا کنیس* در سگ های شهرستان کرمان، جنوب شرق ایران که به دو روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) و روش ایمونوکروماتوگرافی سریع (ICA) انجام شده بود، با بررسی ۱۲۳ سگ شخصی، شیوع کلی ۱۴/۶۳ درصد (IFA برابر با ۱۳/۸ درصد و ICA برابر با ۱۰/۶ درصد) و همچنین در ۱۶/۶۶ درصد موارد مشاهده مورولای تیپیک گزارش شده و ارتباط معنی داری بین هیپرگلوبولینی، ترومبوسیتوپنی، لکوپنی و کم خونی مشاهده نشده است (۲۳).

در مطالعه ای که در شهر اصفهان انجام شده بود، میزان آلودگی به *ارلیشیا کنیس* در سگ های ولگرد ۲۱/۴۲ درصد گزارش شده است که این میزان در مطالعه حاضر و در مورد سگ های نگهبان برابر با ۱۲/۱۴ درصد می باشد، از این رو می توان نتیجه گرفت که شیوع آلودگی در سگ های نگهبان (دارای صاحب) به دلیل توجهات بهداشتی و محل نگهداری مناسب تر نسبت به سگ های ولگرد پایین تر می باشد (۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش مولکولی حساسیت بیشتری نسبت به آزمایش مستقیم اسمیر خونی و رنگ آمیزی برای تشخیص ارلیشیوز در سگ ها داشته و مورولا در مطالعه حاضر در هیچ یک از نمونه ها با علائم بالینی بیماری و حتی در موارد PCR مثبت مشاهده نشده است که با مطالعه بهار یه یزدی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مطابقت دارد (۱۲).

اگرچه مشاهده مورولا می تواند تایید کننده وجود آلودگی در بیماران باشد ولی به دلیل عدم اختصاصی بودن و درصد پایین گزارشات آن نسبت به روش مولکولی دارای حساسیت بسیار کمتری بوده و برخی از مطالعات نیز این نتایج منفی خونی را در سگ های مبتلا به عفونت مزمن نشان داده اند، بر این اساس، آزمایش PCR به عنوان روشی حساس برای تشخیص ارگانیزم ها

به ویژه در مرحله مزمن عفونت پیشنهاد شده است (۳، ۶ و ۲۱). استفاده از روش های تشخیصی دیگری همچون تعیین عیار آنتی بادی توسط آزمایش الایزا، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) و ایمونوکروماتوگرافی سریع (ICA) نیز توسط برخی محققین انجام گردیده است که نتایج قطعی تری در مقایسه با روش آزمایش مستقیم اسمیرخونی و رنگ آمیزی نشان داده است (۱۱، ۱۲، ۱۸، ۲۲ و ۲۳).

در مورد پراکندگی و شیوع کنه ریپسفا/لوس سنگوئینوس مطالعاتی توسط بسیاری از محققین صورت گرفته است که در بیشتر موارد کنه ناقل این بیماری بومی اکثر مناطق دنیا بوده و می تواند به عنوان یک خطر بالقوه در انتقال اجرام انگلی همانند ارلیشیا کنیس مطرح باشد (۵، ۱۳، ۱۷ و ۲۱).

پیش از این، برخی از محققان گزارش کردند که ارلیشیا کنیس می تواند تمام نژادهای سگ را آلوده کند و رابطه بین سن و جنس میزبان در شیوع بیماری وجود ندارد، از این رو در مطالعه حاضر نیز رابطه ای بین سن و جنس میزبان گزارش نگردید (۶ و ۱۱).

شایع ترین ناهنجاری های هماتولوژیک مرتبط با ارلیشیز کم خونی و ترومبوسیتوپنی عنوان می شود که در این مطالعه، کم خونی (هماتوکریت $> 37.0\%$ درصد) و ترومبوسیتوپنی (تعداد پلاکت $\leq 140,000$ در میکرولیتر) در موارد مثبت مشاهده نشد و ارتباط معنی داری بین اختلالات خونی و ارلیشیز وجود نداشت که با مطالعات سایر محققین مطابقت داشته و از این رو می توان نتیجه گرفت که ترومبوسیتوپنی و علائم بالینی نمی تواند بیانگر وجود آلودگی باشد (۱۶، ۲۰، ۲۲ و ۲۳).

میزان آلودگی گزارش شده ارلیشیز از سایر مناطق ایران نشان داد که ایران یک کشور بومی برای این عفونت است و این موضوع با بررسی مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در داخل کشور و کشورهای هم مرز با کشور همچون ترکیه (۹۵)، عراق (۹۶ و ۱۰۶)، پاکستان (۸) و افغانستان (۱۸) که دارای شیوع آلودگی کمتری نسبت به کشور ایران هستند، آلودگی به این انگل در سایر کشورها غیر همسایه همچون کشور هند و مصر نیز گزارش شده است (۴ و ۵).

نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

برخی از گونه های ارلیشیا سگ نیز به عنوان زئونوزهای بالقوه گزارش شده اند بنابراین، نقش سگ های آلوده به عنوان منابع بالقوه عفونت برای انسان، به دلیل جنبه های مشترک بین انسان و دام، به ویژه در افراد دارای نقص ایمنی، حائز اهمیت است و استفاده از روش های مولکولی و توالی یابی برای روشن شدن اهمیت اپیدمیولوژیک بسیاری از بیماری ها مورد نیاز است و همچنین باید مطالعات بیشتری در مورد سایر بیماری های ناشی از کنه مانند آناپلاسما و بابزیوز که ممکن است عفونت های همزمان با ارلیشیا وجود داشته باشد، انجام شود.

تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در جمع آوری نمونه همکاری کردند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.



فهرست منابع

- [1]. Jane E. Sykes, Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat. 5nd ed. Elsevier; 2023. P 522- 41.
- [2]. McBride J.W. Corstvet R.E. Gaunt S.D. Chinsangaram J. Akita G.Y. Osburn B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Diagn Invest. 1996;8:441-447.
- [3]. Khovand H. Nouroollahi Fard S.R. Khalili M. Jajarmi M. Hormozzaie S. Detection of Ehrlichia spp. in ticks collected from stray dogs in Central and Southeastern Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2022;25(4):648-657. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1127-1132.2005>
- [4]. Ratnalikar V. Amruth Kumar V. Nagaraj P. Anil Kumar B. Satish Kumar K. Clinical findings and hemato biochemical alterations in dogs affected with Ehrlichia canis. The Pharma Innovation Journal. 2022;11(9):820-824.
- [5]. Hegab A.A, Omar H.M, Abuowarda M. Screening and phylogenetic characterization of tick-borne pathogens in a population of dogs and associated ticks in Egypt. Parasites Vectors. 2022;15:222. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05348-x>
- [6]. Aslan Çelik B. Yaşar Çelik Ö. Bilgin Yılmaz A. Ayan A. Oruç Kılınç Ö. Özdemir R. Oktay Ayan Ö. Molecular Investigation and Phylogenetic Analysis of Ehrlichia canis in Dogs in Siirt Turkey. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 2022;10(10):1832-1837. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i10.1832-1837.5338>
- [7]. Mohammed Badawi N. Mahmoud Qasim M. Abbas Al-Graibawi M. Mamood Khalaf J. Abdulrahman Yousif A. First Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of Ehrlichia canis in Dogs from Baghdad, Iraq. Archives of Razi Institute. 2022;77(6):2431-2437.
- [8]. Iatta R. Sazmand A. Nguyen VL. Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. Parasitol Res. 2021;120:4219-4228. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06992-x>
- [9]. Choubdar N. Karimian F. Koosha M. Nejati J. Oshaghi MA. Hyalomma spp. Ticks and associated Anaplasma spp. and Ehrlichia spp. on the Iran-Pakistan border. Parasites Vectors. 2021;14:469. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04956-3>
- [10]. Ayan A. Kikinc O. Erdogan S. Akyildiz G. Bia M. Lee D. High Prevalence of Ehrlichia canis in Dogs in Van, Turkey. Ecology and Environmental Research. 2020;18(1):1953-1960. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_19531960
- [11]. Ajaj E. Mohammed H. Al-Bayati L. Seroprevalence of ehrlichiosis in stray dogs in Nineveh Province. Eurasia J Biosci. 2020;14:5883-5887. <https://doi.org/10.1155%2F2019%2F4130210>
- [12]. Baharie Yazdi M. Pourmahdi Borujeni M. Mosallanejad B. Gharibi D. Seroprevalence and risk factors of canine ehrlichiosis in urban and rural dogs in Ahvaz. Iranian Veterinary Journal. 2018;14(3):5-13. <https://doi.org/10.22055/ivj.2018.78317.1878>
- [13]. Jafar Bekloo A. Ramzgouyan MR. Shirian S. Faghihi F. Bakhshi H. Naseri F. Sedaghat M. Telmadarraiy Z. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Anaplasma spp. and Ehrlichia spp. Isolated from Various Ticks in Southeastern and Northwestern Regions of Iran. Vector Borne Zoonotic Disease. 2018;18(5):252-257. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2219>
- [14]. Bigdeli M. Namavari MM. Evaluation of PCR Assay Using Specific Primers in Diagnosis of Canine Ehrlichiosis and Babesiosis: A Study on Herd and Stray Dogs in Shiraz. Journal of Alternative Veterinary Medicine. 2017;1(1):1-15. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.2717378.2017.1.1.1.7>
- [15]. Motaghipisheh Sh. Akhtardanesh B. Ghanbargpour R. Aflatoonian MR. Khalili M. Nouroollahifard SR. Mokhtari S. Ehrlichiosis in Household Dogs and Parasitized Ticks in Kerman- Iran: Preliminary Zoonotic Risk Assessment. 2016;10(2):246-252. <https://jad.tums.ac.ir/index.php/jad/issue/view/30>
- [16]. Derakhshandeh N. Sharifiyazdi H. Abbaszadeh Hasiri M. Molecular detection of Ehrlichia spp. in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction. Veterinary Research Forum. 2016;8(4):347-351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29326795/>
- [17]. Tajedin L. Bakhshi H. Faghihi F. Telmadarraiy Z. High infection of Anaplasma and Ehrlichia spp. among tick species collected from different geographical locations of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2016;6(10):787-792. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61131-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61131-3)

- [18]. Ansari-Mood M. Khoshnegah J. Mohri M. Rajaei SM. Seroprevalence and Risk Factors of Ehrlichia canis Infection among Companion Dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009-2010. Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2015;9(2):184-94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26623430/>
- [19]. Jafarbekloo A. Bakhshi H. Faghihi F. Telmadarraiy Z. Khazeni A. Oshaghi MA. Ramzgouyan MR. Sedaghat MM. Molecular Detection of Anaplasma and Ehrlichia Infection in Ticks in Borderline of Iran. Journal of Biomedical Science and Engineering. 2014;7:919-926.
- [20]. Maazi N. Malmasi A. Shayan P. Nassiri S.M. Zahraei Salehi T. Naderinejad F. Molecular study on Ehrlichia canis in thrombocytopenic dogs. Journal of Veterinary Reserch. 2013;68(2):107-112. <https://doi.org/10.22059/jvr.2013.31956>
- [21]. Khazeni A. Telmadarraiy Z. Oshaghi M. Mohebal M. Zarei Z. Abtahi, S. Molecular detection of Ehrlichia canis in ticks population collected on dogs in Meshkin-Shahr, Ardebil Province, Iran. Journal of Biomedical Science and Engineering. 2013;6:1-5.
- [22]. Avizeh R. Mosallanejad B. Razi Jalali M.H. Alborzi A.R. Seroprevalence of Ehrlichia canis in dogs referred to Veterinary Hospital of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran. Archives of Razi Institute. 2010;65(1): 21-26. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.03653439.2010.65.1.4.9>
- [23]. Akhtardanesh B. Ghanbargpour R. Blourizadeh H. Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. Comparative Clinical Pathology.2010;19:469-474.



"This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws".



Research Article

Molecular Detection of *Ehrlichia Canis* from guard Dogs in Isfahan City, IranSeyed Reza Hosseini¹, Milad Hamzehali Tehrani^{2*}

1. Department of Pathobiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: dr.miladth.vetparasito@gmail.com

Received: 2022/11/6

Accepted: 2022/12/6

Abstract

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is one of the most important infectious diseases of domestic and stray dogs, which is caused by Gram-negative intracellular bacteria and infects monocytes. Dogs are the main reservoir, and *Rhipicephalus sanguineus* tick is the vector of this disease. This disease has a global geographic distribution, but there is little information about the percentage of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) infection in Iran. The present study was conducted to investigate the presence of *E. canis* in guard dogs in Isfahan city. 110 blood samples from guard dogs in the areas of Isfahan city with an average age of 3.5 years were randomly selected and analyzed by direct blood smear and molecular methods. 13 samples (12.14%) were molecularly positive, including seven male dogs (53.84%) and six female dogs (46.15%). Hematological changes were not detectable in infected samples. In examining the percentage of *E. canis* infection with the help of SPSS version 24 software, no significant difference ($p < 0.05$) was observed between the tested age groups. The results show the prevalence of the disease in the guard dogs of Isfahan and considering that some species of Ehrlichiosis are consider potential zoonoses. Therefore, the role of infected dogs as potential sources of infection for humans is important due to the common aspects between humans and animals.

Keywords: *Ehrlichia Canis*, Infected Dogs, PCR, Isfahan, Iran

How to cite this article: Hosseini.R , Hamzehali Tehrani.M. Molecular Detection of *Ehrlichia Canis* from guard Dogs in Isfahan City, Iran. Journal of Zoonosis. Journal of Zoonosis. 2022; 2 (3): 8-18.