بررسی مولکولی و تغییرات هماتولوژیکی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در سگ های آلوده به کنه برای اولین بار در اصفهان، ایران

کیهانی،پ.*[۱]، شیروی،م.[۲]، ممتاز،ح.[۳]،

دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۵ پذیرش:۱۴۰۱/۰۶/۱۹

خلاصه

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه خون سگ آلوده به کنه در اصفهان که از طریق تشخیص مولکولی به روش واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز مورد مطالعه قرار گرفتند، مشخص شد که ۷ نمونه خون، آلوده به آناپلاسما بود. بررسی‌های پاراکلینیکی نمونه‌های مثبت نشان داد که یکی از موارد مثبت (سگ ژرمن شپرد) دچار آنمی شدید، هماتوکریت پایین و نوتروفیلی بالغ بدون لکوسیتوز بوده است. در ۴ مورد مثبت دیگر، کاهش تعداد تام گلبول‌های قرمز و نوتروفیلی بالغ مشاهده گردید و همچنین در دو مورد از این چهار مورد مثبت، افزایش تعداد تام گلبول‌های سفید مشاهده گردید، اما در دو مورد مثبت باقی‌مانده تنها نوتروفیلی بالغ به‌ثبت رسید. با توجه به میزان پراکندگی آلودگی در سگ‌های آلوده به کنه، مشاهدات ثبت شده و نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها، بیانگر این بوده که جنس در بروز بیماری تاثیری ندارد ولی افزایش سن، وضعیت بهداشت محیط نگهداری و فصل در بروز بیماری تاثیرگذار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم، زئونوز، سگ، PCR، اصفهان

۱- *گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانش آموخته دکتری حرفه ایی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
*نویسنده مسئول: dr.p.keihani@gmail.com

مقدمه

در طی چند سال اخیر، خانواده‌ها تمایل زیادی به نگهداری حیوانات خانگی پیدا کرده‌اند و روز به روز نیز برتعدادشان افزوده می‌شود. به همین دلیل، مراقبت‌های دامپزشکی نیز باید با کیفیت بهتری برای سلامت حیوانات آماده گردد. یکی از مهمترین این مسائل بحث زئونوز بودن بیماری‌ها و پیشگیری از آن‌ها است. بیماری، رنج روانی، هزینه‌های سنگین درمان برای مردم و دولت‌ها، ازکار افتادگی، کاهش راندمان تولید تنها بخش کوچکی از زیان‌های وارده در اثر عفونت‌های زئونوز است. در ایران نیز همانند سایر نقاط جهان کنه‌ها و پشه‌ها عامل انتقال اکثر آلودگی‌ها هستند که می‌توانند باعث آلودگی پستانداران(نظیر سگ، گربه، گاو و...) یا پرندگان(که میزبان اصلی یا واسط هستند) شوند. آناپلاسموزیس یک بیماری تحت بالینی خونی است که دارای اهمیت زئونوز نیز است. این بیماری انتشار جهانی دارد و جنس‌های مختلف باکتری، بیماری را در پستانداران اهلی، وحشی و انسان ایجاد می‌کنند. آناپلاسموزیس باعث بروز لکوپنی[1]، ترومبوسیتوپنی[2]، تب پایدار طولانی مدت و افزایش ترانس آمینازهای کبدی در مبتلایان می‌شود. عامل بیماری آناپلاسما نامیده می‌شود و برحسب میزبان، دارای جنس‌های مختلفی است. بروز این بیماری تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله، سن، میزان سیستم ایمنی، دما، رطوبت، موقعیت جغرافیایی، عامل مکانیکی و بهداشت محیط می‌باشد. خسارات ناشی از این بیماری در دام به علت مرگ و میر پایین، ناچیز بوده است و در صورت عدم درمان بیماری، خسارات و مرگ و میر دام به ۵۰٪ هم می‌رسد (نعمان. م،۱۳۹۶;Parkins و همکاران،۲۰۰۹; Júnior و همکاران،۲۰۱۳; Josephus و همکاران،۲۰۱۹ ; Jensen و همکاران،۲۰۰۷).

عفونت آناپلاسمایی معمولا در اثر تماس مستقیم ایجاد می‌شود. علائم کلینیکی و کالبدگشایی برای تشخیص قطعی مورد اطمینان نیستند و باید حتما تست‌های آزمایشگاهی نظیر آزمایش مولکولی یا روش‌های سرولوژی انجام شود. تست الیزا در بین تست‌های سرولوژیکی به علت سریع بودن و دقت بالا ترجیح داده می‌شود. در مطالعه‌ی اخیر از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شده است، زیرا باکتری‌های زنده و مرده را تشخیص می‌دهد، که نشان دهنده‌ی حساس‌تر بودن این روش است. ضمن اینکه نتایج حاصل نیز سریع‌تر به‌دست می‌آیند. همچنین برای شناسایی مخزن بیماری نیز می‌توان از این روش استفاده کرد. متاسفانه در ایران با توجه به گسترش فرهنگ نگهداری حیوانات خانگی هیچ‌گونه تحقیقی در رابطه با آناپلاسموز در سگ و گربه با توجه به زئونوز بودن آن صورت نگرفته است و بدیهی است باید اقدامات و فعالیت‌های تحقیقاتی بیشتری در این زمینه صورت گیرد تا به توانیم به پیشرفت سلامت جامعه و افزایش سطح علمی دامپزشکان و پزشکان به‌افزاییم و زمینه‌ی حفظ سلامت حیوانات را نیز فراهم آوریم (Cardoso و همکاران۲۰۱۲ ; Chandrashekar و همکاران۲۰۰۸; Krämer و همکاران ۲۰۱۴ ; Moroff و همکاران۲۰۱۴; Yabsley و همکاران، ۲۰۸۸) . بنابراین در این مطالعه به دنبال بررسی و تشخیص مولکولی آناپلاسما در سگهای آلوده به کنه در استان اصفهان می باشد.

مواد و روش کار

۲-۱. جامعه ی آماری:

جامعه‌ی آماری مورد مطالعه تعداد ۱۰۰ قلاده سگ آلوده به کنه از مناطق مختلف شهر اصفهان بود که بر اساس سن به ۲ دسته، زیر ۱سال ۳۸ قلاده، بین ۱ تا ۴ سال ۶۲ قلاده، بر اساس جنس در دو دسته نر ۲۸ قلاده و ماده ۷۲ قلاده، بر اساس محیط زندگی نیز به سه دسته‌ی سگ های گله و نگهبان ۲۹ قلاده، سگ‌های خانگی ۱۵قلاده و ولگرد ۵۶ قلاده که همگی به کنه آلوده بودند تقسیم بندی شدند.

۲-۲. نمونه گیری:

در شروع برای انجام این تحقیق ابتدا حیوان را مقید ساخته (بستن پوزه حیوان) و سپس اقدام به تراشیدن دست جهت نمونه‌گیری از ورید سفالیک نموده و سپس موضع را ضدعفونی کرده (با استفاده از الکل) و در نهایت حجمی معادل ۵ سی‌سی از خون حیوان جمع آوری گردید. بعدازآن، نمونه خون گرفته شده در داخل لوله‌ی آزمایش حاوی ماده‌ی ضدانعقاد ریخته شد و سپس در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

۲-۳. ارسال نمونه و محل انجام آزمایش‌ها:

از مجموع ۵ سی‌سی نمونه خون گرفته شده از هر سگ در نقاط مختلف شهر اصفهان، میزان ۲ سی‌سی از آن جدا شده و جهت آزمایش‌های هماتولوژی (CBC) در لوله‌های مخصوص و در دمای ۴درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه آرین دام اصفهان ارسال شد. حجم ۳ سی‌سی باقی‌مانده نمونه خون اخذ شده، جهت انجام آزمایش‌های مولکولی و جداسازی ژنوم به روش Nested PCR در دمای ۲۰c°- نگهداری شد. برای انجام این روش نمونه‌ها به آزمایشگاه

تخصصی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال و آزمایش نیز انجام پذیرفت.

۲-٤. آماده سازی نمونه در آزمایشگاه:

نمونه خون کامل حاوی ماده ضدانعقاد ۱۰٪ (EDTA) از سگ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و لایه‌های بافی کوت (لایه‌ی حاوی گلبول‌های سفید خون) از هر نمونه جدا و با افزودن ۴ برابر حجم، محلول استریل ۰/۲ درصد Nacl به آن، گلبول قرمز موجود لیز و بلافاصله هم حجم آن محلول استریل۷/۲ درصد Nacl جهت ایزوتونیک شدن نمونه به هر لوله اضافه شد. نمونه‌های لیز شده در ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و گلبول های سفید باقی مانده با افزودن ۱ میلی لیتر بافر سالین فسفات (Na_2HPO_4 وKH_2PO_4 و NaCL و KCl و PBS) شستشو داده شد. در نهایت بافی کوت جدا شده از هر نمونه خون در ۱ میلی لیتر PBS تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰c° نگهداری گردید.

۲-۵. آزمایش‌های خون شناسی (CBC):

آزمایش‌های هماتولوژیکی، با کمک دستگاه سل کانتر و اتوآنالایزر با دقت بالا انجام گرفت.

۲-٦. استخراج DNA:

به منظور استخراج ژنوم از نمونه‌های مورد بررسی از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناکلون استفاده شد و حضور ژن MSP4 با کمک زوج پرایمرهای زیر انجام گرفت (یوسفی و همکاران ۲۰۱۹).

راند اول , AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 :
AGCACTCATCGTTTACAGCG-3
راند دوم GCAAGCTTAACACATGCAAGTC-3 :
,5-TTAAGCCCTGGTATTTCAC-3

واکنش آزمایش مولکولی در هر دو مرحله درجمع ۲۵ میکرولیتر بود که واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰میکرومول Dntp Mix، ۲ واحد آنزیم(Taq DNA Polymorase)، ۲ میکرو لیتر DNA مربوط به هر نمونه و ۱میکرومول از زوج پرایمرهای مربوط به هر مرحله که تنظیم شده بود(۱۳). برنامه‌ی دمایی مورد استفاده در هر دو مرحله PCR شامل، یک سیکل ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰سیکل تکراری ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه، ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۶۵درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود

نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه خون اخذ شده از سگ‌های آلوده به کنه در شهر اصفهان، تعداد ۲۷قلاده نر و ۷۳قلاده ماده بودند. از نظر محیط نیز به سه دسته‌ی سگ‌های گله و نگهبان ۱۶ قلاده، سگ‌های خانگی ۱۵قلاده و ولگرد ۶۹ قلاده که همگی به کنه آلوده بودند، تقسیم می‌گردیدند. همچنین بر اساس سن به دو دسته زیر ۱سال ۳۸ قلاده و بین۱تا۴سال ۶۲ قلاده تقسیم شدند. نهایتا پس از انجام روش تشخیص مولکولی، تعداد ۷ مورد آلوده به آناپلاسما و تعداد ۹۳ مورد منفی گزارش گردید(جدول۱ و شکل۱).

از مجموع ۱۶ قلاده سگ گله ونگهبان، تعداد ۲ قلاده (۱۲/۵ درصد) مثبت بودند و تعداد ۱۴ قلاده (۸۷/۵ درصد) منفی بودند.

ازمجموع ۶۹ قلاده سگ ولگرد، تعداد ۵ قلاده (۷/۲ درصد) مثبت بودند و تعداد ۶۴ قلاده (۹۲/۸ درصد) منفی بودند.

از مجموع ۲۷ قلاده نر، تعداد ۲ قلاده (۷/۴ درصد) مثبت بودند و تعداد ۲۵ قلاده (۹۲/۶ درصد) منفی بودند.

از مجموع ۶۳ قلاده ماده، تعداد ۵ قلاده (۷/۹ درصد) مثبت بودند و تعداد ۵۸ قلاده (۹۲/۱ درصد) منفی بودند(شکل۲).

در بررسی هماتولوژیکی نمونه‌ها، یک نمونه دچار آنمی شدید، هماتوکریت پایین و نوتروفیلی بدون لوکوسیتوز بوده، ۴ مورد دیگر دچار افزایش گلبول‌های قرمز، نوتروفیلی و دو مورد فقط دچار افزایش گلبول‌های سفید بودند و نهایتا دو مورد دیگر هم فقط دچار نوتروفیلی بودند.

نهایتا در تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون دقیق فیشر و سطح اطمینان ۹۵ درصد، نتایج زیر حاصل گردید(شکل۳):

اختلاف آماری معناداری بین نژاد و میزان آلودگی وجود ندارد.(PO=۰/۲۳۶)

اختلاف آماری معناداری بین فصل و میزان آلودگی وجود دارد.(PO=۰/۰۲۳)

اختلاف آماری معناداری بین سن و میزان آلودگی وجود دارد.(PO=۰/۰۳۲)

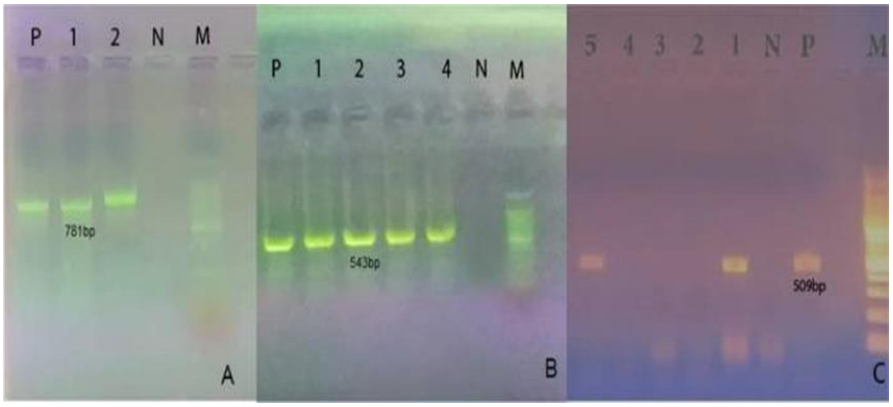
اختلاف آماری معناداری بین جنسیت و میزان آلودگی وجود ندارد.(PO=۰/۲۳۶)

اختلاف آماری معناداری بین وضعیت نگهداری سگ(خانگی/بومی/نگهبان) و میزان آلودگی وجود دارد.(PO=۰/۰۳۱)

نژاد	تعداد	تعداد نمونه های سالم	تعداد نمونه های آلوده به آناپلاسما	تعداد نمونه در هر فصل				سن		جنس		ولگرد/ خانگی/ نگهبان			
				زمستان	بهار	تابستان	پاییز	زیر ۱سال	بالای ۱ سال	نر	ماده	ولگرد		خانگی	نگهبان
				سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار	سالم / بیمار		سالم / بیمار	سالم / بیمار
زرمن شیرد	۶	۵	۱	۱ / ۰	۲ / ۰	۲ / ۱	۰ / ۰	۱ / ۱	۰ / ۱	۳ / ۱	۲ / ۰				۵ / ۱
هاسکی	۲	۲	۰	۱ / ۰	۱ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۲ / ۰	۰ / ۰	۰ / ۰	۲ / ۰			۲ / ۰	
دوبرمن	۱	۰	۱	۰ / ۰	۱ / ۱	۰ / ۰	۰ / ۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۰ / ۱				۰ / ۱
ژرمز	۸	۸	۰	۰ / ۰	۳ / ۰	۴ / ۰	۱ / ۰	۸ / ۰	۰ / ۰	۲ / ۰	۶ / ۰			۸ / ۰	
اشپیتز	۲	۲	۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۲ / ۰	۰ / ۰	۰ / ۰	۲ / ۰			۲ / ۰	
شپارزو	۲	۲	۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۱	۰ / ۰	۲ / ۰			۲ / ۰	
فهریجانی	۷	۷	۰	۱ / ۰	۲ / ۰	۳ / ۰	۱ / ۰	۲ / ۰	۵ / ۰	۵ / ۰	۲ / ۰				۷ / ۰
پیکینز	۱	۱	۰	۰ / ۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۱ / ۰	۰ / ۰	۰ / ۰	۱ / ۰			۱ / ۰	
بومی	۶۹	۶۶	۵	۱۱ / ۰	۱۸ / ۱	۳۷ / ۴	۶ / ۰	۱۰ / ۱	۵۰ / ۴	۱۵ / ۱	۵۲ / ۴	۶۴ / ۵			۲ / ۰
جمع کل	۱۰۰	۹۳	۷	۱۴ / ۰	۲۷ / ۲	۴۶ / ۲	۵ / ۶	۳۶ / ۲	۵۷ / ۵	۲۵ / ۲	۶۸ / ۵	۶۴ / ۵	۱۵ / ۰	۱۴ / ۲	۲
				۱۴		۵۱	۶	۳۸	۶۲	۲۷	۷۳	۶۹	۱۵	۱۶	

جدول ۱. اطلاعات تفکیک شده در جمعیت مورد مطالعه

شکل۱. میزان آلودگی به آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در جمعیت نمونه‌های مختلف



شکل۲. ژل حاصل از آزمایش PCR

شکل۳. نتایج آنالیز آماری با روش فیشر(کمتر از ۰/۱ عامل در بروز بیماری تاثیر گذار است)

بحث

از گذشته تا به امروز تمایل انسان به نگهداری سگ، برای استفاده‌های مختلف هرروز بیشتر شده است، علی الخصوص در این برهه زمانی که تمایل خانواده‌ها به نگهداری سگ بیشتر از زمان‌های قبل است. لذا باید به بهداشت و بیماری سگ توجه نمود و از آن‌ها اطلاع داشت. با ظهور بیماری مشترک بین انسان و دام و تحت‌الشعاع بودن سلامتی انسان در خصوص بیماری‌های زئونوز و بررسی‌های مختلفی که در این زمینه در کشورهای اروپایی بر روی این قبیل بیماری‌ها انجام شده است، تصمیم به بررسی میزان آلودگی آناپلاسما در شهر اصفهان برروی سگ‌های آلوده به کنه نمودیم. این بیماری جز بیماری‌های زئونوز بوده که در خارج از ایران تحقیقات زیادی برروی آن انجام شده است و همچنین در ایران بر روی سگ‌های روستایی استان خوزستان و نیز سگ‌های تهران تحقیق انجام شده است، که نتایج حاصل در تمامی این بررسی‌ها بیانگر وجود آلودگی به آناپلاسما با درصدهای مختلف در سراسر دنیا و ایران می‌باشد. با تمامی این توصیف‌ها اقدام به بررسی این عامل کردیم. با توجه به کمبودهای آزمایشگاهی و مشکلات اقتصادی و وجود تحریم و مشکلاتی از این قبیل، باید یادآور شد که بررسی این عامل در ایران بر روی سگ‌ها لازم و ضروری است و نباید در انجام این‌گونه تحقیقات کوتاهی کرد(حمیدی نژاد و همکاران،۲۰۱۸؛ یوسفی و همکاران، ۲۰۱۹؛ *Kim* و همکاران،۲۰۰۶).

همانطور که گفته شد آناپلاسموز در سگ‌ها توسط آناپلاسما که یک باکتری گرم منفی، پلی مورف(چند شکلی) وانگل اجباری درون سلولی است و جز خانواده آناپلاسمیده طبقه بندی شده، ایجاد می‌شود. عامل این بیماری در خون با ایجاد مورولا اقدام به تکثیر می‌کند و عامل انتقال و حامل آناپلاسما به طور عمده کنه‌ها و پشه‌ها هستند که نقش مهمی را در انتقال آن ایفا می‌کنند. البته امکان دارد که در معاینه بالینی سگ هیچ‌گونه کنه ایی مشاهده نگردد ولی سگ آلوده باشد که احتمالا باید به آلوده بودن سگ به یک نوع بندپا در گذشته شک کرده و در این حالت می‌توان با گرفتن تاریخچه به این حدس اعتماد بیشتری کرد(یوسفی و همکاران، ۲۰۱۹؛ *greene* و همکاران، ۲۰۱۲).

در مشاهدات آزمایشگاهی در سوئد و آمریکا با تقلیح عامل به صورت داخل وریدی به این نتیجه رسیدند که اولا عامل حتما باید در خون بوده تا بتواند رشد نماید و بیماری را ایجاد کند. دوما ممکن است سگ آلوده باشد ولی هیچگونه علامتی از بیماری را بروز ندهد(*greene*و همکاران، ۲۰۱۲).

عامل اکثرا به صورت تحت بالینی باعث ایجاد بیماری می‌شود و علائم کلینیکی از ملایم تا شدید شامل تب، سردرد، سرگیجه و ضعف می‌باشد. کمتر از ۵۰درصد بیماران دچار حالت تهوع، استفراغ، اسهال، سرفه، التهاب مفصل بوده‌اند(*greene*و همکاران،۲۰۱۲؛ *Yabsley* و همکاران، ۲۰۰۸).

عامل با تغییرات هماتولوژیکی همانند ازبین بردن گلبول های سفید، کاهش گلبول‌های قرمز، باعث افزایش احتمال آلودگی سگ‌ها به بیماری می‌شود. برای شناسایی گونه‌های آناپلاسما، در آزمایش‌های سرولوژی به طور مثال با استفاده از روش فلورسنت غیرمستقیم، بخاطر تیتر پایین آنتی بادی و واکنش‌های سرولوژیکی متقابل بین گونه‌های مختلف آناپلاسما، تشخیص نوع گونه سخت می‌باشد(*Cardoso* و همکاران۲۰۱۲ *greene* و همکاران۲۰۱۲).

روش مولکولی به عنوان یک روش دقیق و حساس در تشخیص آلودگی با باکتری آناپلاسما استفاده شده است. این

روش هم آسان و هم سریع بوده و از دقت بالایی برخوردار است. این روش قابلیت تشخیص آلودگی حتی با درصد ناچیز عامل در خون را دارد. به عنوان یک روش کمکی برای طرح‌های ریشه‌کنی انواع بیماری‌ها، همچنین در مواقعی که آزمایش‌های سرمی در تشخیص به ما کمک نمی‌کنند، استفاده می‌گردد. در روش‌های سرمی به علت واکنش‌های متقاطع بین گونه‌ها و همچنین به علت پایین بودن سطح آنتی بادی، نتایج منفی کاذب ایجاد شده که می‌تواند باعث عدم شناسایی سگ‌هایی شود، که در ابتدای بیماری هستند. در کل به علت حساسیت زیاد آزمایش ملکولی در تشخیص آناپلاسما حتی در مراحل اولیه آلودگی، استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی برای شناسایی و کنترل آناپلاسموز کارایی مناسب‌تری را دارا می‌باشند. لازم به ذکر است در ایران بررسی بر روی آناپلاسما اکثرا بر روی گاو و گوسفند انجام پذیرفته و با توجه به زئونوز بودن بیماری و افزایش تمایل برای نگهداری حیوانات خانگی و اهمیت سلامت افراد جامعه برآن شدیم که نسبت به بررسی میزان آلودگی آناپلاسما به روش مولکولی اقدام نمائیم(هاشمی نژاد و همکاران،۲۰۱۸؛ *greene* و همکاران،۲۰۱۲).

در سال ۲۰۰۷ توسط میشل جاکوبسنی مطالعه و تحقیقاتی درآمریکا برروی ارلیشیا کنیس، آناپلاسما کنیس، بابزیا، هپاتوزون، ریکتزیا انجام پذیرفته است. این تحقیق بر روی سرم ۱۰۴ قلاده سگ و با روش سرولوژی- مولکولی انجام پذیرفته و نتایج این تحقیق به این صورت که، (۴۲/۳٪) ۴۴ قلاده سگ برای آناپلاسما کنیس و (۴۳/۸٪) ۳۲ قلاده سگ برای ارلیشیا کنیس در آزمایش سرولوژی مثبت گزارش شدند. در روش مولکولی برای ارلیشیا کنیس(۱۸ قلاده و ۲۴٪/۷)، آناپلاسما کنیس(۱۴ قلاده و ۱۹/۲٪)، بابزیا(۵ قلاده و ۷٪)، بارتونلا[۷](۱ قلاده و ۱/۴٪) و ریکتزیا(۰) آلوده گزارش شده اند. تمام پاتوژن‌ها توسط کنه‌ی ریپیسفالوس سانگوایئوس منتقل شده بودند(*Yabsley* و همکاران،۲۰۰۸).

در سال ۲۰۱۲ توسط ویکتور دیاچکنکو مطالعه و تحقیقاتی درآلمان بر روی جداسازی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم از نمونه‌های خون سگ‌های آلوده به اگزودس ریسینوس انجام شد. قبل از انجام این آزمایش در پژوهش‌های قبلی، آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم از کنه‌ی اگزودس اسکپولاریس و همچنین از محیط کشت سلول خطی پرومیلوسیت *HL60* جدا شده بود. با این وجود در این مطالعه از اگزدوس ریسینوس با سلول *IRE/CTVM20* در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد برای کشت نمونه‌های حاصل استفاده شد. نمونه خون‌ها از دو قلاده سگ، که یکی در آلمان و دیگری در استرالیا گرفته شده بودند، انجام پذیرفت. نتیجه‌ی حاصل بدین گونه بود که بعداز ۸۶ روز از انکوباسیون محیط رشد، حاوی ریکتزیا بودند. عامل را بعد از دو بار پاساژ در محیط *IRE/CTVM20* به محیط کشت *I.scapularis cell line(ISE6)* منتقل کردند و آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم به خوبی رشد کرد(*Dyachenko* و همکاران،۲۰۱۳).

سال۲۰۱۴ توسط اسکات مورف و همکارنش مطالعه و تحقیقاتی در آمریکا بر روی جداسازی آنتی بادی علیه، آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم با روش فلورسانس انجام شد. آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در سرم سگ‌سانان قابل ردیابی است. بدین گونه که ۷ قلاده سگی که به طور عادی عامل به آن‌ها تلقیح شده بود و ۳۶ قلاده سگی که به مدت ۷ روز در معرض اگزودس اسکپولاریس قرار گرفته بودند از آن‌ها نمونه خون وسرم گرفته شد. نمونه سرم‌ها به روش الیزا و روش غیرمستقیم فلورسانس(*IFA*) بررسی شد. نتایج به دست آمده بدین صورت بود که از ۳۶ قلاده سگی که در معرض بودند تا روز هفتم، ۷ قلاده مثبت شدند و در روزچهاردهم، ۹ قلاده مثبت و تا روزبیست ویکم، ۴قلاده مثبت و در هفته چهارم، ۱قلاده مثبت و هفته‌ی پنجم نیز، ۱قلاده سگ مثبت شدند، نتیجه‌ی حاصل از این پژوهش بعد از تحلیل نتایج به این صورت بود که اگزودس اسکپولاریس در انتقال عامل نقش دارد(*Morff* و همکاران،۲۰۱۴).

در سال ۲۰۱۴ توسط فردریک کرامر مطالعه و تحقیقاتی بر روی ۳۰۹۴ نمونه سرمی اخذ شده از سگ‌های ۱۶ منطقه‌ی هلند انجام شد. هدف از انجام این پژوهش ردیابی، حضور آنتی بادی علیه بورلیا بورگدورفی سنسو لاتا، ارلیشیا کنیس، آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم با استفاده از کیت‌های الیزا بود. نتیجه‌ی جالب به‌دست آمده این بود که از نمونه‌های سرمی، یک سگ همزمان به ۳ عامل مذکور آلوده بود. کرامر از کلینیسین‌ها خواسته تا نسبت به بیماری های منتقله از کنه هوشیارتر بوده و از مردم و حیوانات در مقابل این بیماری‌ها محافظت کنند(*Kramer* و همکاران،۲۰۱۴).

در سال۲۰۱۷ توسط ونسنزو و همکارانش مطالعه و تحقیقاتی بر روی سگ‌های شکاری جنوب ایتالیا انجام دادند. اهداف این آزمایش بدین صورت بود که، عواملی که توسط کنه‌ی سگ*(CVBD's)* منتقل می‌شوند، را شناسایی کند. این عوامل شامل بورلیا بورگدورفی سنسولاتا، ارلیشیا کنیس، گونه‌های مختلف آناپلاسما و دیروفیلاریا ایمیتیس بودند. وی از ۱۳۸ قلاده سگ شکاری، نمونه خون گرفته و بعد از جداسازی سرم نمونه‌ها، با استفاده از کیت‌های الیزا به بررسی نمونه‌ها پرداخت. از ۱۳۸ قلاده مورد بررسی شده (معادل۱۰/۳٪)، حداقل به یکی از عوامل فوق آلوده بودند، که از این درصد به میزان۲/۲٪ (معادل۳۰قلاده)، به ارلیشیا کنیس و گونه‌های مختلف آناپلاسما آلوده بودند. گزارش این

تحقیق بدین گونه منتشر شد که، سگ‌های شکاری جنوب ایتالیا در معرض ابتلا به بیماری‌های انتقال یافته از کنه‌ها هستند(*Vincenzo* و همکاران،۲۰۱۷).

همچنین در یک تحقیقی که جدیدا درسال ۲۰۱۹ در تهران توسط دکتر یوسفی و همکاران برروی ۱۵۰ نمونه خون سگ انجام پذیرفته، بعد از تهیه اسمیر و رنگ آمیزی نمونه‌های خون به روش گیمسا نسبت به شناسایی آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم اقدام کردند که فقط در ۰/۶۷ درصد موارد آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم مشاهده شد. با انجام آزمایش مولکولی بر روی همان نمونه‌ها ۲درصد از موارد مثبت شدند که نشان از دقت بالای روش مولکولی دارد. همچنین یادآور شدند سن وجنس هیچ‌گونه تاثیری برای ظهور بیماری ندارند(یوسفی و همکاران، ۲۰۱۹).

در تحقیقی که توسط ما در سال۲۰۱۹ انجام شد بعد از نمونه‌گیری از ۱۰۰ قلاده سگ و انجام آزمایشات هماتولوژی و مولکولی به این نتیجه رسیدیم که ۷ قلاده سگ(۷درصد)، دچار بیماری آناپلاسموزیس هستند. با توجه به آنالیز داده‌ها، جنس در بروز بیماری تاثیر گذار نبوده اما افزایش سن، محیط و فصل در بروز بیماری تاثیرگذار هستند.

طی بررسی و مقایسه نتایج مطالعات در مورد آناپلاسما، متوجه شدیم که که میزان شیوع آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در بررسی‌های مولکولی به‌طور میانگین ۷تا۱۰ درصد به ازای هر ۱۰۰ سگ می‌باشد. در مقایسه این پژوهش با سایر پژوهش‌ها آلودگی سگ‌ها به آناپلاسموز درصد کمتری را شامل می‌شود.که با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت که رسیدگی صاحبان سگ‌های خانگی در اصفهان بسیار با کیفیت عالی است و همین امر باعث آلودگی پایین سگ‌ها به این عامل است. با این حال مجددا به زئونوز بودن این بیماری اشاره می‌کنیم که می‌تواند سلامت انسان را به خطر باندازد و ضررهای اقتصادی هم داشته باشد.

در ایران نیز همانند سایر کشورهای دنیا با افزایش تقاضا افراد برای نگهداری حیوانات خانگی بخصوص سگ و گربه رو به رو هستیم پس باید به موضوع سلامت و بهداشت آن‌ها بیشتر از قبل توجه کنیم و خواسته یا ناخواسته آن‌ها را با خطرات احتمالی مواجه نکنیم که از جمله این مخاطرات می‌توان به بیماری‌های زئونوز اشاره نمود که در این تحقیق بیماری مشترک آناپلاسموز مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت.

در کشورهای پیشرفته مطالعات و تحقیقات جامعی بر روی انواع بیماری‌ها انجام گرفته است، که آناپلاسموز نیز شامل این قضیه می‌شود، ولی در ایران به علت محدودیت‌های جامعه و لوازم آزمایشگاهی، پژوهش جامعی در مورد آناپلاسموز انجام نشده است.

از دیگر مشکلاتی که در طی انجام این تحقیق به آن برخوردیم، عدم آگاهی کافی صاحبان سگ و همچنین برخی پزشکان و دامپزشکان و حتی پرورش دهندگان در مورد بیماری آناپلاسموز و علائم آن می‌بود، که این موضوع باعث درمان ناقص یا کورکورانه بدون شناخت عامل و بیماری است. و بخاطر عدم بهداشت محیط، عدم شناخت منبع و مخزن عامل و همچنین گستردگی محیط بیرون نمی‌توان این بیماری را کنترل کرد و مجددا ظهور می‌کند. عدم آگاهی کامل و در اکثر موارد آگاهی نداشتن باعث شده که سلامت جامعه‌ی انسانی و حیوانی تحت تاثیر قرار بگیرد.

به علت مشکلات اقتصادی که مردم ایران دچار آن شده‌اند و همچنین به علت گرانی دارو و هزینه ویزیت، صاحبان سگ ترجیح می‌دهند که تا حیوانشان دچار بیماری نشده آن را به کلینیک نیاورند که این خطایی است که ناشی از ناآگاهی آن‌ها می‌باشد. چرا که هزینه‌های درمان گران‌تر از کنترل و پیشگیری بیماری‌ها است. که همین امر باعث شده که بیماری‌ها قابلیت کنترل را نداشته باشند و حیوان اکثرا دچار فرم حاد بیماری‌ها شود. پرورش دهندگان نیز از این موضوع مستثنا نیستند. عدم رعایت بهداشت محیط نیز بر شیوع هرچه بیشتر بیماری و گسترش عامل بیماری دامن می‌زند.

با در نظر گرفتن این موضوع که در زمینه ی بررسی میزان آلودگی سگ‌ها به بیماری آناپلاسموز به طور ناچیز مطالعاتی انجام گرفته و اکثرا بر روی گاو و گوسفند بوده و همچنین آگاهی از خطرات این بیماری زئونوز برای انسان‌ها به علت افزایش تمایل افراد به نگهداری سگ به عنوان حیوان خانگی لازم و ضروری می‌باشد. بررسی حاضر با هدف شناسایی و ردیابی میزان آلودگی سگ‌ها به آناپلاسما با استفاده از روش *PCR* برای اولین بار در اصفهان انجام پذیرفت.

در این تحقیق از ۱۰۰ قلاده سگ که با روش *PCR* بررسی شدند، ۷ مورد(۷درصد) آلوده با آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم تشخیص داده شدند. در مقایسه نتایج این تحقیق با سایر پژوهش‌ها، آلودگی به آناپلاسما(نسبت به میانگین درصد آلودگی)، از میزان کمتری برخوردار بود، ولی با این حال باید به این بیماری توجه کرد و آگاهی مردم را نسبت به بیماری‌هایی از این دست افزایش داد، تا به‌توان از وقوع آن‌ها پیشگیری کرد. در اولین قدم نیز باید آگاهی دامپزشکان و پزشکان از این بیماری بالاتر رود تا با توصیه به صاحبان دام نسبت به معاینات کامل دوره‌ایی اقدام کنند تا از درگیری‌ها و مشکلات حاصل از بیماری کاسته شود.

با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با روش دقیق فیشر و سطح اطمینان ۹۵درصد، اختلاف معنی داری بین فصل، بهداشت محیط و وضعیت سگ به دست آمد

(شکل۳)، همچنین می‌توان به نژاد ژرمن شپرد به عنوان یک نژاد مستعد شک کرد. لازم به ذکر است با افزایش سن، کاهش سیستم ایمنی و تغذیه نامناسب، حیوان مستعد درگیری به آناپلاسموز می‌شود. فصل تابستان به علت افزایش حضور کنه‌ها و ناقل‌های بیماری میزان آلودگی افزایش شدیدی داشت. با این حال جنس حیوان هیچ‌گونه اختلاف معناداری با توجه به نتایج حاصل از روش فیشر به دست نیامد(شکل۳، جدول ۱).

در موارد مشابه، توجه به الگوی هماتولوژیکی، علائم بیماری و ارتباط صفات مورد نظر با میزان شیوع بیماری و استفاده از روش *PCR* می‌تواند تشخیص بیماری آناپلاسموز را آسان‌تر می‌کند.

Journal of Veterinary Laboratory Research 14 (2022) 73-83

Haematological changes and molecular detection of Anaplasma phagocytophilum in tick infested dogs in Isfahan Provice,Iran.

Keihani, p. [1*], Shiravi, M.[2], Momtaz, H.[3].

Received: 05.06.2021 Accepted: 10.09.2022

Abstract

In this study, 100 blood samples of tick-infested dogs in Isfahan were collected and examined for molecular detection by Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) method. Seven blood samples were found to be infected with Anaplasma phagocytophilum and their results were positive. Hematological studies of positive samples were showed that, in one of them, severe anemia, low hematocrit and neutrophillia without leukocytosis was seen.In four of them, anemia and neutrophilia (in 2 of them had leukocytosis also) was seen. and in two other positive samples, only neutrophilia was seen. In morbidity of the Anaplasma phagocytophilum infection in tick infested dogs, our examination and stastical analysis of data reveals that, age and contamination of the environement were affected but the genus were not affected the incidense of the disease.This study were conducted in four seasons of one year and it was done by the first time in Esfahan,middle province of Iran.

Keywords: Anaplasmosis,"Dog,"PCR,"Esfahan.

1.Department of clinical science,Veterinary faculty ,Shahrekord Branch,,Islamic Azad University, Shahrekord,Iran

2.Department of clinical scince, veterinary faculty,Shrekord Branch,Islamic Azad university,Shahrekord, Iran

3. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: dr.p.keihani@gmail.com

منابع

نعمان. م،۱۳۹۶، " مروری بر آناپلاسموزیس و وضعیت شیوع آناپلاسما مارجیناله در گاوهای ایران و جهان،" فصلنامه دامپزشکی **۳(۳۰).**

Cardoso, L., Mendão, C., Luís Madeira de Carvalho.2012. Prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Leishmania infantum in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal-a national serological study. Parasites & Vectors. **5(1), p.62**.

M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P., Mainville, C., Hegarty,B.C., Crawford, J.M., Breitschwerdt, E.B..2008. Serological and molecular prevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia species in dogs from Minnesota.Vector Borne Zoonotic Diseases 8,pp**.455–464**

Costa-Júnior, L.M., Rembeck,K. L.M.F. Passos, M.F.B. Ribeiro.2013."Factors associated with epidemiology of Anaplasma platys in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. Preventive veterinary medicine. 109(3-4), pp.**321-326.**

Dyachenko V., Geiger C. N.Pantchev, M. Majzoub , L. Bell-Sakyi , , R. k Straubinger.2013. Isolation of canine Anaplasma phagocytophilum strains from clinical blood samples using the Ixodes ricinus cell line IRE/CTVM20. Veterinary microbiology. 162(2-4),pp**.980-986**.

Greene E.Craig, Jane Sykes. 2012. Infectious diseases of the dogs and cat,Elsivier. 4th edition. **1,244-259.**

Hamidinejad H., Bahrami S., Mosalanejad B., Pahlavan S.. 2018. First molecular survey on Anaplasma phagocytophilum revealed high prevalence in rural dogs from Khuzestan province,Iran. Iran J Parasitol. 14, No.2,pp**. 297-302.**

Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J..2007. Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany. Zoonoses Public Health. **54(3-4),p.169.**

Josephus J. Fourie, Alec Evans, Michel Labuschagne, D. Crafford, M.Madder, M. Pollmeier, B. Schunack. 2019. Transmission of Anaplasma phagocytophilum by Ixodes ricinus ticks feeding on dogs and artificial membranes. Parasites & Vectors. **12,p.136.**

Kim JH, Lee CS, Moon C, Kwak YG, Kim BN, Kim ES, Kang JM, Park WB, Park SW..2006. Co-Infection of scrub typhus and human granulocytic Anaplasmosis in Korea. J Korean Med Sci.**14;34(39),pp. 257**.

Krämer, F.,Roland Schaper,B.Schunack,A.Połozowski.,J. Piekarska, 2014. Serological detection of Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu

lato and Ehrlichia canis antibodies and Dirofilaria immitis antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. Parasitology research. 113(9), pp.**3229-3239.**

Michael D Parkins,Deirdre L Church, Xiu Yan Jiang,D.B.G.. 2009. Human granulocytic Anaplasmosis-First reported case in Canada,Can J Infect Dis Med Microbiol, 20(3),pp.**100-102.**

Moroff, S., I. Sokolchik, T.W., C.W.. 2014. Detection of antibodies against Anaplasma phagocytophilum in dogs using an automated fluorescence based system. The Veterinary Journal. 202(2), pp.**348-352.**

Vincenzo Veneziano, D.P, B.N., F.DP.. 2017. Seroprevalence and risk factors associated with E.canis,Anaplasma spp,Borrelia burgdorfi senso lato and Dirofilaria immitis in hunting dogs from southern Itlay. Parasitology research.116,pp**. 2651-2660.**

Yabsley, M.J., McKibben, J., M.CN,C.PF.,. 2008. Prevalence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia Canis Vogeli, Hepatozoon Canis, Bartonella Vinsonii Berkhoffii, and Rickettsia spp. in dogs from Grenada. Veterinary parasitology. 151(2-4), pp.**279-285.**

YousefiA., M. R. Chaechi Nosrati,A. Golmohammadi, S. A. .2019.Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum as a zoonotic agent im owned and straydogs in Tehran,Iran., Archives of Razi Institute. Archive 4, volume74,pp**33-38.**