نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106061

بررسی فراوانی بابزیا در سگ‌های نواحی شهری و روستایی شهرستان تبریز

• **مهدی حسین زاده ورجوی**
دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• **جواد اشرفی هلان**
استاد آسیب شناسی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• **نسرین صالحی**
استادیار انگل شناسی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• **احد بازمانی**
کارشناسی ارشد انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز
• **احمد نعمت اللهی**
استاد انگل شناسی،گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• **عباس ایمانی باران (نویسنده مسئول)**
استادیار انگل شناسی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴
Email: a.imani@tabrizu.ac.ir

چکیده

بابزیوزیس سگ‌سانان یک بیماری مهم ناشی از گونه‌های بابزیا بوده و دارای اهمیت بهداشتی و انتشار جهانی است. این بیماری در سگ‌ها نخست به عنوان یک بیماری استوایی و تحت استوایی در نظر گرفته می‌شد، اما به تازگی افزایش وقوع آن در مناطق معتدل دنیا نیز مشخص شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی آلودگی به تک‌یاخته‌ی بابزیا در سگ‌های شهرستان تبریز و حومه بود. از ۱۲۱ قلاده سگ به صورت تصادفی نمونه‌ی خون تهیه شد. به روش میکروسکوپی گسترش‌های نازک خون محیطی و به روش مولکولی با تکثیر قطعه‌ی به طول ۴۱۶ جفت باز از توالی ژن 18S rDNA آلودگی سگ‌ها به بابزیا بررسی شد. در بررسی مولکولی و میکروسکوپی به ترتیب ۲۲(۱۸/۲٪) و ۸(۶/۶٪) نمونه از همه‌ی مناطق آلوده بودند. بیشترین میزان آلودگی در سگ‌های تجاری (۲۸/۶٪)، نر (۱۹/۲٪) کمتر از دو سال (۲۱/۱٪) بود. اختلاف معنی داری بین فراوانی آلودگی با شاخص‌های فردی دام‌ها مشاهده نگردید. در این مطالعه تشخیص مولکولی آلودگی بابزیای سگ در مقایسه با روش میکروسکوپی کارایی بیشتری داشت و بررسی‌های تکمیلی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: بابزیا ، سگ، تبریز

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 56-63

A survey on Babesia infection in dogs of urban and rural regions of Tabriz city, Iran

By: Hosseinzadeh Varjoy, M., DVM, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Ashrafi Helan, J., Professor-Pathology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Salehi, N., Assistant Professor- Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Bazmani, A., Parasitology MSc,Tabriz Research Center of Infectious and Tropical Diseases, Tabriz, Iran. Nematollahi, A., Professor-Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Imani Baran, A., (Corresponding Author) Assistant Professor- Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: August 2015 Accepted: November 2015

Email: a.imani@tabrizu.ac.ir

Canine babesiosis is an important disease caused by Babesia spp. and is of healthy importance and cosmopolitan distribution. This disease was initially considered as a tropical and subtropical disease. Recently, increasing occurrence of canine babesiosis has also been detected on temperate areas of the world. The aim of present study was survey on frequency of canine babesiosis in dogs from Tabriz and suburb. A total of 121 blood samples were randomly taken from dogs. Babesia Infection was survived with microscopic examination of thin layer smears from peripheral blood and amplification of 416 bp fragment of 18S rDNA using molecular method. Out of 22(18.2%) and 8(6.6%) of 121 blood samples were positive for Babesia in all study areas in molecular and microscopic survey, respectively. Commercial (28.6%), male (19.2%) and 2> years old (21.1%) dogs had the highest infection rates. No significant differences were found between geographic distribution of infection and obtained data. In this study, it was indicated that molecular detection of canine babesiosis is of more efficiency than microscopic method and further supplemental surveys is suggested.

Key words: Babesia, Dog, Tabriz

مقدمه

بابزیوزیس یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای جهان‌شمول و دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است (۱). عامل این بیماری گونه‌های مختلف جنس بابزیا بوده و انواع کنه‌های ایکسودیده طیف وسیعی از میزبان‌های حیوانی اهلی و وحشی را آلوده می‌کنند. بابزیوزیس در سگ‌ها نخست به عنوان یک بیماری استوایی و تحت استوایی در نظر گرفته می‌شد، اما به تازگی افزایش وقوع آن در مناطق معتدل دنیا نیز تشخیص داده شده است (۲). این بیماری در سگ‌سانان در نواحی مختلف دنیا چهره‌ی درمانگاهی متفاوتی دارد، زیرا شدت و نوع علائم بالینی و بیماری‌زایی با گونه و سویه‌ی انگل، سن و ایمنی میزبان، درجه‌ی پارازیتمی، نوع کنه‌ی ناقل و بومی بودن یا نبودن بیماری در یک منطقه تغییر می‌کند و براساس شدت علائم بالینی و تغییرات هماتولوژیک به اشکال فوق حاد، حاد، مزمن، تحت بالینی و آتیپیک تقسیم‌بندی می‌شود (۳). گونه‌های بابزیا از انواع داخل اریتروسیتی هستند و باعث علائمی چون آنمی، تب شدید، زردی، بزرگی طحال و کبد، ترومبوسیتوپنی، نوتروپنی، آنیزوسیتوز و گاهاً هماچوری و هموگلوبینوری می‌شود (۴-۷). در گذشته آلودگی بابزیا در سگ بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی انگل در داخل اریتروسیت‌ها شناسائی می‌شد و بدین ترتیب تمامی بابزیاهای بزرگ به عنوان بابزیا کنیس تشخیص داده می‌شدند، و تمامی بابزیاهای کوچک بابزیا جیبسونی در نظر گرفته می‌شدند (۸). به طور کلی، به دلیل معرفی سویه‌های زیادی از گونه‌های بابزیای سگ‌سانان که به لحاظ بالینی گاهاً علائم مشابهی دارند و نیز هم‌پوشانی جغرافیایی برخی از این سویه‌ها، تشخیص بابزیوزیس سگ‌سانان از طریق مشاهده‌ی میکروسکوپی انگل‌ها در گسترش‌های خون محیطی، آزمایشات سرولوژیکی، فلوسایتومتری و روش‌های بیولوژی مولکولی صورت می‌گیرد (۷، ۹ و ۱۰). پیشرفت‌های اخیر در روش‌های مولکولی، تشخیص و شناسایی پیروپلاسم‌ها را با حساسیت و ویژگی بالاتری در مقایسه با روش‌های قدیمی امکان‌پذیر ساخته است (۱،۱۱).

محققان زیادی نقاط اوج فصلی در شیوع بابزیای مرتبط با ناقل و سایر دینامیک‌های انتقال را در کشورهای زیادی توصیف کرده‌اند (۱۲،۱۳). تاکنون مطالعات محدودی در خصوص شیوع، تنوع گونه‌ای بابزیا، چهره‌ی درمانگاهی و فون کنه‌های ناقل آن در سگ در ایران (۳،۹،۱۴،۱۵) صورت گرفته است ولی تحقیقی در این زمینه در استان آذربایجان‌شرقی انجام نشده است. بنابراین، این مطالعه به منظور تعیین میزان آلودگی بابزیا در سگ‌های شهرستان تبریز انجام شد.

مواد و روش کار

دام‌ها و نمونه‌ها

ایـــن مطالعه بر روی نمونه‌های خون ۱۲۱ قلاده ســـگ از انواع مختلف (گله، خانگی، تجاری، نگهبان و ولگرد) که به صورت تصادفی از شهرســـتان تبریز و روســـتاهای اطـــراف در فاصله‌ی زمانی از خردادماه ســـال ۱۳۹۰ تا تیرماه ســـال ۱۳۹۱ اخذ گردیده بودند، انجام شـــد. مشخصات سگ‌ها در جدول ۱ ثبت شده است.

در طول نمونه‌برداری، هر دام از نظر جســـمی معاینه شـــد و نخســـت نمونه‌هـــای خون از ورید گوش اخذ گردید و گســـترش‌های نازک به تعداد دو نمونه برای هر دام به منظور آزمایش میکروسکوپی تهیه شدند و پس از خشک شـــدن گسترش‌های تهیه شده و تثبیت نمودن آنها با الکل متانول، لام‌ها به طـــور جداگانه برای جلوگیری از تغییرات احتمالی و پاک شـــدن گسترش خون لای کاغذهای تمیز پیچانده شدند. برای انجام آزمایش PCR از هر قلاده سگ ۲ سانتی‌متر مکعب خون از ورید سفالیک دست با استفاده از سرنگ استریل اخذ و به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA وارد شد و تمامی مشخصات و متغیرهای مورد نیاز برای مطالعه ثبت شدند. نمونه‌ها همراه کیســـه‌های یخ در داخل یونولیت‌ها بلافاصلـــه به مرکز بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشـــکی تبریز واقع در بیمارستان سینا انتقال داده شدند و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ °C- ذخیره شدند.

رنگ‌آمیزی و بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی

ابتدا گسترش‌های نازک خونی تهیه شده که در زمان نمونه‌برداری ثابت شـــده بودند، با استفاده از روش هماتوکســـیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و برای جســـتجوی تروفوزوئیت‌های بابزیا حداقـــل ۱۰۰ میدان دید در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× به دقت بررسی شدند (۹).

استخراج DNA و تکثیر قطعه‌ی به طول ۴۱۶ جفت باز از توالی ژن ۱۸S rRNA

در این مرحله اســـتخراج DNA بابزیـــا از ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های خون کامل EDTA دار با استفاده از کیت پاکژن یاخته (DNA Extraction Kit, Pakgene Yakhteh, Iran) طبق دســـتور شرکت سازنده‌ی کیت انجام گرفت. برای تکثیر قطعه‌ای تقریباً به طول ۴۱۶ جفت باز از توالی ژنی ۱۸S rRNA با کد دسترسی HQ۶۶۲۶۳۴,۱، پرایمرهایی با مشخّصات زیر:

Babc-FForward (CACAGGGAGGTAGTGACAAG)

Babc-RRevers (CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT)

طراحی شدند و ســـفارش ساخت آنها توسط شـــرکت زیست فناوری کوثر داده شد. هم‌چنین برای حصول اطمینان از اینکه تمام نمونه‌ها دارای DNA سگ می‌باشند، یک جفت پرایمر داخلی نیز با مشخصات زیر:

DOG F Forward (TGCAAGTGCCAAGTTTACAGA)

DOGRRevers(ACTTCGGTGTATTGCGGAGGCGTAGGTG)

طراحی شـــدند و بعد از ساخت آنها توسط شرکت زیست فناوری کوثر مورد استفاده قرار گرفتند.

بطـــور خلاصه، هر مخلوط واکنش در حجـــم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر X۱۰، ۳ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۵۰ میلی مـــول dNTPs، ۵ واحـــد آنزیم TaqDNA پلی‌مـــراز و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو بود. تکثیر PCR با اســـتفاده از دســـتگاه ترمال سایکلر قابل برنامه‌ریزی مـــدل Astec (PC701 Thermal Cycler; Astec, Fukuoka, Japan) با برنامه‌ی زمان‌بندی زیر انجام شـــد: یک واسرشت اولیه در دمای ۹۴ °C بـــه مدت ۵ دقیقه، کـــه بعداً با ۴۰ چرخه به ترتیب واسرشـــت در دمـــای ۹۴ °C به مدت ۴۰ ثانیه، اتّصال در دمای ۶۳ °C به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۴۰ ثانیه دنبال شـــد. یک مرحله‌ی تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه نیز انجام شـــد. ۸ میکرولیتر از هر محصول تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۲٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شـــد. کنترل مثبت بابزیا از نمونه‌های موجود در آرشـــیو انگل‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز که از مطالعه‌ی قبلی (۳) در اســـتان آذربایجان‌شـــرقی به دست آمده بودند، تهیه گردید.

ارزیابی آماری

در ایـــن تحقیق از آزمون مربع کای (χ^2) بـــرای ارزیابی ارتباط داده‌ها اســـتفاده شـــد. تجزیه و تحلیل‌های داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (Version 14, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) با حدود اطمینان ۹۵٪ و ارزش احتمالی $p<۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار بودن از نظر آماری استفاده شد.

نتایج

در بررسی میکروسکوپی گسترش‌های نازک خون، تنها نمونه‌های خون اخذ شده از ۸ قلاده سگ (۶/۶٪) از نظر آلودگی با تک‌یاخته‌ی بابزیا مثبت بودند (شکل ۱).

بـــا اســـتفاده از روش PCR، در مجمـــوع ۲۲(۱۸/۲٪) نمونـــه از ۱۲۱ نمونه‌ی جمع‌آوری شـــده از نظر آلودگی با جنس بابزیا مثبت بودند (شکل ۲). آلودگی ســـگ‌ها تقریباً در تمام مناطق نمونه‌برداری مشاهده شدند که بالاترین درصد آلودگی متعلق به جنوب‌شـــرقی (۲۳/۸٪) و پائین‌ترین آن مربوط به شمال‌غربی (۸/۳٪) شهرستان تبریز بود (جدول ۱). در بین انواع سگ‌ها از نظر کاربری، سگ‌های تجاری بالاترین (۲۸/۶٪) و سگ‌های ولگرد پائین‌ترین (صفر) درصد آلودگی را از خود نشـــان دادند (جدول ۱)، که به لحاظ جنســـیت نیز در بین سگ‌های ماده بالاترین درصد آلودگی (۱۰۰٪) مربوط به ســـگ‌های تجـــاری و پائین‌ترین آن (صفر) مربوط به ســـگ‌های گله، نگهبان و ولگرد بود. همین طور، در بین ســـگ‌های نر بالاترین درصد آلودگی (۲۵٪) مربوط به ســـگ‌های نگهبان و پائین‌ترین آن (صفر) مربوط به ســـگ‌های ولگرد بود. در مجموع معلوم شد که ســـگ‌های نر بیشترین (۱۹/۲٪) آلودگی را نســـبت به ســـگ‌های ماده از خود نشان دادند. در بین روســـتاهایی که از آنجـــا نمونه‌برداری به عمل آمـــد در اکثر موارد آلودگی با درصدهای متفاوت مشـــاهده شـــد. به طوری که، بالاترین درصد آلودگی (۳۳/۳٪) متعلق به روســـتای کُردلَر و پائین‌ترین آن (صفر) مربوط به ســـه روستای: بارانلو، گوار و لاهیجان بود (جدول ۲). در این مطالعه، برای ارزیابی تأثیر شـــاخص نژاد در میزان آلودگی، سگ‌های مورد مطالعه عمدتاً متعلق بـــه دو نژاد بومی و مخلوط بودند کـــه درصد آلودگی مربوط به هر دو گروه نژادی تا حدودی یکســـان بود (جدول ۳). از نظر شـــاخص سنی، سگ‌های مورد مطالعه به ســـه زیر گروه: کمتر از ۲ سال، ۴-۲ سال و بالاتر از ۴ سال تقسیم شدند که بر حسب این گروه‌بندی بیشترین درصد آلودگی (۲۱/۱٪)

با بابزیا متعلق به گروه اول (<۲) و کمترین درصد آلودگی (۱۶/۷٪) نیز به سگ‌های ۴-۲ سال تعلق داشت. هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در میانگین پراکندگی آلودگی بابزیا در مناطق مختلف جغرافیایی شهرستان (۰/۶۲۸ < p)، کاربری سگ‌ها (۱/۰۰۰ >p برای سگ‌های نگهبان و ۰/۵۸۵ >p برای سگ‌های گله)، جنس (۱/۰۰۰ >p برای سگ‌های گله، خانگی، نگهبان و ولگرد و نیز ۰/۲۸۶ >p برای سگ‌های تجاری)، پراکندگی مناطق مختلف جغرافیایی (به تفکیک روستا) (۰/۹۶۷ > p)، نژاد (۰/۹۱۲ > p)، نحوه‌ی نگهداری (۱/۰۰۰ > p) و در سنین مختلف (۰/۹۰۰ > p) وجود نداشت. در ارتباط با علایم بالینی در مورد سگ‌های مورد مطالعه لازم به ذکر است که در هیچ یک از سگ‌ها علائم بالینی بابزیوزیس حاد و یا تحت بالینی مشاهده نگردید. البته، در یک قلاده سگ نژاد ساموئید که به کلینیک دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز ارجاع شده بود و نمونه‌ی خون از آن اخذ شده بود، دارای علائم بالینی زردی، هپاتومگالی، تب و بسیار مشکوک به بابزیوزیس بود که در بررسی میکروسکوپی و مولکولی هیچ‌گونه آلودگی بابزیایی مشاهده نگردید.

بحث

از آنجایی که دامنه‌ی جغرافیایی پیروپلاسم‌های اختصاصی ظاهراً در حال گسترش است (۱۶)، بنابراین «موقعیت جغرافیایی» نباید تنها معیاری برای شناسایی گونه یا تحت گونه مورد استفاده قرار گیرد (۱۷) به لحاظ تشخیصی، تعیین گونه، تحت‌گونه و ژنوتیپ‌هایی که باعث بابزیوزیس سگ‌سانان می‌شوند مهم به نظر می‌رسد، چون «حدّت»، «پیش آگهی» و «پاسخ به داروهای ضد بابزیایی» ممکن است برای هر ارگانیسمی متفاوت باشد (۱۸). آزمایش میکروسکوپی ساده‌ترین و در دسترس‌ترین شیوه‌ی تشخیصی برای تشخیص انگل‌های داخل اریتروسیتی هست ولی همانندی بین گونه‌ها و تحت گونه‌ها عامل محدود کننده برای این روش محسوب می‌شود (۱۹). آزمایش سرولوژیکی، خصوصاً اگر با PCR همراه باشد، یک روش مفید برای تشخیص سگ‌های آلوده هست ولی ویژگی پایین، ناتوانی در تشخیص تفریقی آلودگی حاد از مزمن محدودیت اصلی این روش هستند (۲۰). روش مولکولی یک ابزار قدرتمندی هم برای تعیین ژنوتیپ و هم در مواردی که گسترش‌های خونی نمی‌توانند تشخیص درستی را فراهم کنند، در نظر گرفته می‌شود. بنابراین پیشرفت‌های اخیر در روش‌های مولکولی، تشخیص و تعیین هویت پیروپلاسم‌ها را با حساسیت و ویژگی بالاتر نسبت به روش‌های متعارف امکان‌پذیر ساخته‌اند (۲۱).

با استفاده از روش‌های مولکولی، برای گونه‌ی بابزیا کنیس سه تحت گونه‌ی بابزیا کنیس کنیس، بابزیا کنیس ووگلی و بابزیا کنیس رزی شناسایی شده است. مطالعات اخیر بر روی مشخّصات مولکولی پیروپلاسم‌های کوچک سگ‌ها نشان داده‌اند که حداقل سه ژنوتیپ مشخص به لحاظ ژنتیکی وجود دارد (۱۰،۲۲،۲۳). در این مطالعه که در واقع اولین مطالعه به منظور تعیین فراوانی و تشخیص بابزیوزیس سگ‌سانان در منطقه تبریز به روش مولکولی بود، میزان آلودگی به بابزیا در سطح شهرستان تبریز و حومه مشخّص شد. اگر چه استفاده از روش معمول میکروسکوپی در این مطالعه فراوانی آلودگی بابزیایی را ۶/۶ درصد نشان داد، ولی تشخیص آلودگی در ۱۸/۲ درصد سگ‌ها با استفاده از روش مولکولی اهمیت استفاده از این روش را در چنین مطالعات اپیدمیولوژیکی و میدانی نمایان می‌سازد.

در تحقیق حاضر، میزان آلودگی به بابزیا در سطح شهرستان تبریز در مناطق مختلف جغرافیایی آن از پراکندگی یکسانی برخوردار بود و اختلاف آنها از نظر آماری معنی‌دار نبود (۰/۰۵ > p). با این حال، بیشترین میزان آلودگی به بابزیا در مناطق جنوب شرقی بود که می‌تواند به دلیل شرایط آب و هوایی خیلی مطلوب، فراوانی مراتع و تراکم بالای احشام در این منطقه باشد و در چنین وضعیتی احتمالاً شرایط برای ازدیاد جمعیت کنه‌های ناقل بیماری مساعدتر بوده و موجب میزان بالاتر آلودگی در این منطقه گشته است، چون از نظر اپیدمیولوژیکی اعتقاد بر این است که پراکندگی جغرافیایی عامل سبب‌ساز و وقوع بابزیوزیس کاملاً به پراکندگی ناقل مناسب و میزبان مستعد بستگی دارد (۲۴) و از طرفی شرایط نامطلوب زیستی از جمله درجه حرارت‌های بالای محیطی موجب diapause کنه‌های ناقل، محدود شدن فعالیت تولید مثلی و رفتار میزبان‌یابی آنها می‌شوند و در نتیجه شانس آلوده شدن میزبان کاهش یافته (۲۵) و نهایتاً شیوع پایین بابزیای سگ‌سانان به وقع می‌پیوندد (۹).

در این مطالعه، بیشترین میزان آلودگی به بابزیا، بر اساس کاربری سگ‌ها در مناطق مختلف به ترتیب در سگ‌های تجاری مناطق جنوب غربی و جنوب شرقی مشاهده شد که دلایل آن می‌تواند حجم کم نمونه از سگ‌های تجاری، شرایط نامساعد بهداشتی، غیر قانونی بودن فعالیت مراکز تجاری، نبود نظارت، عدم انجام درمان ضدانگلی (داخلی و خارجی)، عدم توجه به تغذیه‌ی سگ‌ها و نیز عدم توجه به مسائل بهداشتی این سگ‌ها باشد که موجب کاهش سطح ایمنی در این سگ‌ها شده و آنها را مستعد به بیماری می‌کند.

در این تحقیق، بیشترین میزان شیوع در گروه سنی کمتر از ۲ سال بود که می‌تواند به دلیل عدم مواجهه‌ی قبلی سیستم ایمنی سگ‌ها با آنتی‌ژن‌های عوامل بیماری برای کسب ایمنی اختصاصی در سنین پائین در مقایسه با سگ‌های مسن‌تر باشد که نتایج تحقیق Bashir و همکاران در پاکستان (۲۶) و O'Dwyer و همکاران در برزیل (۱۷) این مطلب را تأیید می‌کند. هم‌چنین، در تحقیقی که جلالی و همکاران در اهواز (۹) انجام داده‌اند ارتباط معنی‌داری از نظر آماری در مورد میزان آلودگی به بابزیا با سن مشاهده نگردیده است. اختلاف معنی‌داری بین فراوانی آلودگی به بابزیا و جنس سگ‌ها نبود. این یافته با نتایج مطالعه‌ی رازی جلالی و همکاران در اهواز (۹)، Omudu و همکاران در نیجریه (۲۷)، Ilie و همکاران در هند (۲۸)، Bashir و همکاران در پاکستان (۲۶) و O'Dwyer و همکاران در برزیل (۱۷) هم‌خوانی داشت.

در این مطالعه بین فراوانی آلودگی به بابزیا و نژاد سگ‌ها ارتباط معنی‌داری نبود که با مطالعه Omudu و همکاران در نیجریه (۲۷)، Ilie و همکاران در هندوستان (۲۸) هم‌خوانی داشت.

در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط معنی‌داری از نظر آماری بین آلودگی به بابزیا و محل نگهداری سگ‌ها مشاهده نگردید. با این حال، میزان آلودگی در سگ‌هایی که خارج از خانه نگهداری می‌شدند بیشتر از سگ‌هایی بود که داخل خانه نگهداری می‌شدند. به طور کلی، نشان داده شده است که تحت شرایطی که سگ‌ها نگهداری می‌شوند وقوع بابزیوزیس مستقیماً تحت تأثیر همان شرایط قرار دارد (۲۹) و آلودگی بیشتر در دام‌های مناطق روستایی مشاهده می‌شود. ممکن است تماس بیشتر سگ‌ها با کنه‌سانان و تا حدودی شرایط بد زندگی و مراقبت آنها دلیل عمده‌ی شیوع بالای این بیماری در

سگ‌های این مناطق و یا محیط هستند (۳۰). هم‌چنین، سگ‌هایی که داخل خانه نگهداری می‌شوند، به طور مرتب توسط صاحبان‌شان شست و شو می‌شوند و به مسائل بهداشتی این سگ‌ها بیشتر توجه می‌شود. هم‌چنین، چون این سگ‌ها در محیط شهری زندگی می‌کنند احتمال برخورد با میزبان واسط در چنین محیطی کمتر می‌باشد.

در این مطالعه نیز در توافق با تمام مطالعات اپیدمیولوژیکی انجام گرفته در سطح دنیا، اهمیت و حساسیت بالای آنالیز مولکولی در بررسی فراوانی بابزیوزیس سگسانان در مقایسه با روش روتین میکروسکوپی به اثبات رسید و نتایج به دست آمده با تفاوت فاحش از نظر آماری و فرآیند انجام آزمایش نمونه‌ها هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی برتری روش PCR را با سایر روش‌ها به خوبی نشان داد. نتایج این مطالعه مشخص نمود که علی‌رغم مشاهده نشدن هیچ نشانی از بابزیوزیس در سگ‌ها، این آلودگی در بین جمعیت سگ‌های شهرستان تبریز و مناطق جغرافیایی مختلف آن بیش از آنچه انتظار می‌رفت به شکل تحت درمانگاهی وجود دارد و حضور این آلودگی با چنین شرایطی بیانگر پراکندگی میزبان‌های ناقل آلوده در منطقه، عدم توجه به سگ‌های حامل از نظر درمان و در نتیجه گردش مداوم انگل در بین میزبان و ناقل می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به ثمر رسیدن این پروژه که قسمتی از پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی به شماره‌ی ۴۳/۳۴۱۷د می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Jefferies R, Ryan UM, Muhlnickel CJ, Irwi PJ. Two Species of canine Babesia in Australia: Detection and Characterization by PCR. *J Parasitol 2003;* 89(2): 409-412.

2. Shaw ES, Day JM. Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat. 1st edn. Manson Press, United Kingdom, 2005; 63–67.

3. Ashrafi Helan J, Haddadzadeh HR, Shirani D, Khazraiinia P, Mostofi S. Histopathologic, hematologic and clinical study on canine Babesiosis. *J Fac Vet Med 2001;* 56(3): 93–96. (Text in Persian)

4. Kuttler KL, Zaugg JL, Yunker CE. The pathogenicity and immunologic relationship of a virulent and a tissue-culture-adapted Babesia bovis. *Vet Parasitol 1988;* 27: 239-244.

5. Mathe A, Voros K, Papp L, Reiczigel J. Clinical manifestations of canine Babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung 2006;* 54: 367–385.

6. Neer TM, Harrus SH. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis. In: Greene CE (ed) Infectious diseases of the dog and cat, 3rd edn. WB Saunders, Philadelphia, 2006; 203–219.

7. Zygner W, Gjska O, Rapacka G, Jaros D, Wedrychowicz H. Hematological changes during the course of canine Babesiosis caused by large Babesia in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet Parasitol.* 2007; 145: 146–151.

8. Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 885–904.

9. Razi-jalali MH, Mosallanejad B, Avizeh R, Alborzi1 AR, Hamidi-Nejat H, Taghipour R. Babesia infection in urban and rural dogs in Ahvaz district, Southwest of Iran. *Arch Razi Inst.* 2013; 68(1): 37-42.

10. Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer AJ, Cummings J, Boudreaux MK, Stockham SL, Irizarry-Rovira A, Conrad PA. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *Inter J Parasitol.* 2000a; 30: 1501–1505.

11. Foldvari G, Hell E, Farkas R. *Babesia canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Vet Parasitol.* 2005; 127: 221–226.

12. Leschnik M, Kirtz G, Tichy A, Leidinger E. Seasonal occurrence of canine Babesiosis is influenced by local climate conditions. *Inter J Med Microb*. 2008; 298: 243–248.

13. Maia MG, Costa RT, Haddad JPA, Passos LMF, Ribeiro McFB. Epidemiological aspects of canine Babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, *Brazil. Prev Vet Med.* 2007; 79: 155–162.

14. Niak A, Anwar M, Khatibi S. Canine Babesiosis in Iran. *Trop Anim Health Prod*. 1973; 5: 200-201.

15. Bigdeli M, Rafie S, Namavari M, Jamshidi Sh. Report of *Theileria annulata* and Babesia canis infections in dogs. *Comp Clin Pathol.* 2012; 21:375-377.

16. Criado-Fornelio A, Gonzalez-del-Rio MA, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. The "Expanding Universe" of Piroplasmas. *Vet Parasitol*. 2004; 119(43): 337-345.

17. O'Dwyer LH, Lopes VVA, Rubini AS, Paduan KDS, Ribolla PEM. Babesia spp. infection in dogs from rural areas of Sao Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal.* 2009; 18(2): 23-26.

18. Birkenheuer AJ, Levi MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microb.* 2003; 41(9): 4172-4177.

19 Sadeghi Dehkordi Z, Zakeri S, Nabian S, Bahonar A, Ghasemi F, Noorollahi F, Rahbari S. Molecular and biomorphometrical identification of ovine babesiosis in Iran. *Iranian J Parasitol.* 2010; 5(4): 21-30.

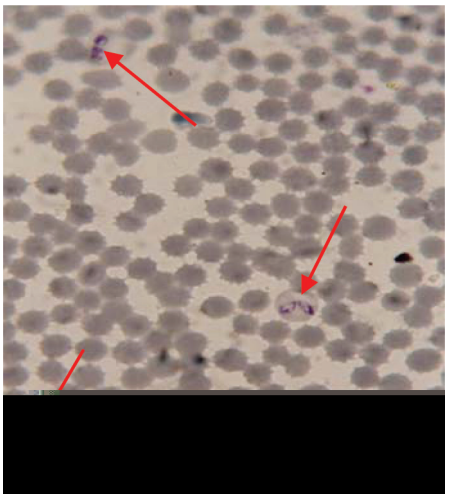
20. Yamane I, Thomford JW, Gardner IA, Dubey JP, Levy M, Conrad PA. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am J Vet Res.* 1993;

54: 1579-1584.
21. Martin AR, Dunstan RH, Roberts TK, Brown GK. *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Exp Parasitol.* 2006; 112: 63-65.
22. Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R. Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs. *Vet Parasitol.* 2000a; 89, 241–248.
23. Zahler M, Rnder H, Zweygarth E, Fukata T, Maede Y, Schein E, Gothe R.''*Babesia gibsoni*'' of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitol*. 2000b; 120:365–369.
24. Konvalinova J, Rudolf I, Silvie S, Hubalek Zd, Svobodova V, Svoboda M. Contribution to canine babesiosis in the *Czech Republic. ACTA VET BRNO*. 2012; 81: 091–095.
25. Maia MG, Costa RT, Haddad JPA, Passos LMF, Ribeiro McFB. Epidemiological aspects of canine Babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Prev Vet Med.* 2007; 79: 155-162.
26. Bashir N, Chaudhry ZI, Ahmed S, Saeed MA. Epidemiological and vector identification studies on canine babesiosis. *Pak Vet J.* 2009; 29(2): 51-54.
27. Omudu EA, Bernard O, Ayashar JG. Epidemiological survey of canine babesiosis in Makurdi, *Nig Anim Res Inter*. 2007; 4(3): 745-749.
28. Ilie MS, Darabus G, Imre K, Hotea I. Survey of canine babesiosis in Banat area. Bullen UASVM Vet Med 2010; 67(2): 125-130.
29. Bourdoiseau G. Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol.* 2006; 138: 118–125.
30. Adaszeka L, Martinez AC, Winiarczyk S. The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. *Vet Parasitol.* 2011; 181: 160-165.

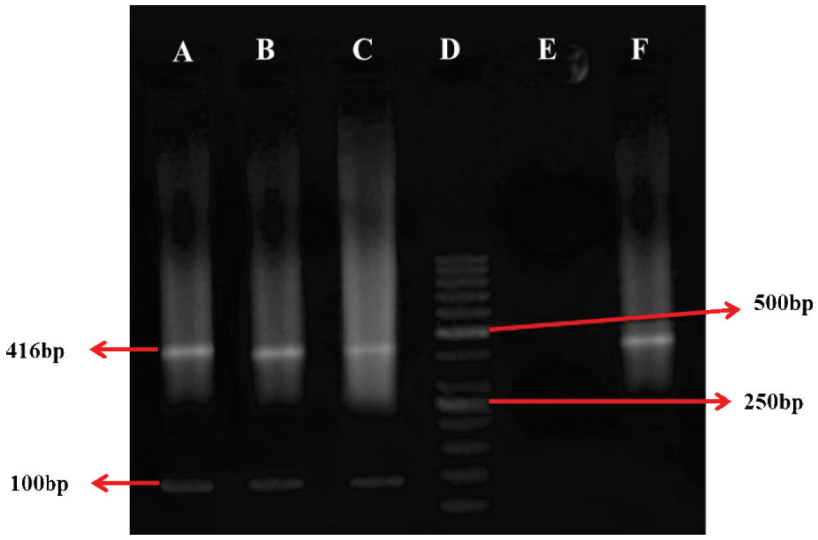
جدول ۱- فراوانی بابزیا درسگ های نواحی شهری و روستایی شهرستان تبریز بر حسب مناطق، سن، نژاد، جنس و کاربری

نام روستا		گوار	مکیان	کلینیک ارک	کلینیک دانشگاه	کلینیک سینا	اصفهلان	بارانلو	کردلر	لاهیجان	لیقوان	باسمنج	اسپراخان	سهلان	جمع کل
مناطق		E	E	C	C	C	SW	SW	SW	SW	SE	SE	SE	NW	
تعداد نمونه		۳	۱۸	۱۲	۶	۱۱	۳۲	۱	۳	۲	۴	۹	۸	۱۲	۱۲۱
تعداد دام آلوده (٪)		–	۳(۲/۵)	۲(۱/۷)	۱(۰/۸)	۱(۰/۸)	۸(۶/۶)	–	۱(۰/۸)	–	۱(۰/۸)	۲(۱/۷)	۲(۱/۷)	۱(۰/۸)	۲۲(۱۸/۲)
سن[۱]	۲> (۳۸)[۲]	–	–	۱	۱	–	۲	–	۱	–	۱	–	۲	–	۸
	۲-۴ (۳۰)[۲]	–	–	۱	–	۱	۲	–	–	–	–	۱	–	–	۵
	۴< (۴۱)[۲]	–	۲	–	–	–	۴	–	–	–	–	۱	–	۱	۸
نژاد	بومی (۸۳)[۲]	–	۳	–	–	–	۶	–	–	–	۱	۲	۲	۱	۱۵
	مخلوط (۳۸)[۲]	–	–	۲	۱	۱	۲	–	۱	–	–	–	–	–	۷
جنس	نر (۱۰۴)[۲]	–	۳	۱	۱	۱	۷	–	۱	–	۱	۲	۲	۱	۲۰
	ماده (۱۷)[۲]	–	–	۱	–	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	۲
کاربری	گله (۷۹)[۲]	–	۳	–	–	–	۶	–	–	–	۱	۲	۲	۱	۱۵
	خانگی (۲۵)[۲]	–	–	۲	۱	۱	–	–	–	–	–	–	–	–	۴
	نگهبان (۶)[۲]	–	–	–	–	–	–	–	۱	–	–	–	–	–	۱
	تجاری (۷)[۲]	–	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	–	–	۲
	ولگرد (۴)[۲]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

۱) سن ۲۱ قلاده قابل تخمین نبود. ۲) از تعداد کل نمونه می باشد.C: شهر تبریز،E: شرق، WS: جنوبغربی، ES: جنوبشرقی، WN: شمالغربی



شکل ۱- نمای میکروسکوپیک گسترش نازک خونی تهیه شده از سگ مبتلا به بابزیوزیس:
مروزوئیت های انگل بابزیابه صورت دوتائی و گلابی شکل در داخل اریتروسیت ها در تصویر فوق (رنگ آمیزی گیمسا، درشت نمائی 1000×).



شکل۲- محصولPCR از تکثیرقطعه ی ۶۱۴ جفت بازی از توالی ژن 18S rDNA تک یاخته بابزیا در سگ های آلوده(چاهک :D: مارکر مولکولی bp100، F: کنترل مثبت، E: کنترل منفی، C-A (ردیف بالا): باندهایbp416 مربوط به بابزیاوC-A(ردیف پایین): باندهایbp100 مربوط به کنترل داخلی)