

بررسی آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در سگ‌های ولگرد استان‌های قزوین، گیلان و مازندران

ابراهیم زاده،^{۱*}، خلیلی،^۲، س.،^۳، فتاحی،^۴، ر.،^۵، گرامی صادقیان،^۶، ع.،^۷، آهو، م.ب.،^۸

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

خلاصه

کریپتوسپوریدیوزیس بیماری روده‌ای است که از راه دهانی - مدفوعی انتقال می‌یابد و سبب اسهال و حتی مرگ در حیوانات و انسان‌های دارای نقص سیستم ایمنی می‌گردد. در بررسی حاضر نمونه مدفوع به طور مستقیم از راست روده ۸۵ قلاده سگ ولگرد (۵۲ قلاده سگ نر و ۳۳ قلاده سگ ماده) در سنین ۶ تا ۱۲ ماه به صورت تصادفی جمع آوری شد. اووسیست‌ها در ابتدا توسط روش رسوبی فرمالین اثر تغلیظ گردیدند، سپس جهت شناسایی میکروسکوپی از رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده استفاده گردید. تک یاخته کریپتوسپوریدیوم در یک نمونه از مجموع ۸۵ نمونه مدفوع مورد بررسی شناسایی شد و شیوع آلودگی در سگ‌های ولگرد تحت مطالعه ۱/۱ درصد اعلام گردید. با توجه به شیوع پایین این تک یاخته در سگ‌های ولگرد مناطق شمالی ایران و توجه به این نکته که سگ‌ها اکثراً به گونه کریپتوسپوریدیوم کنیس آلوده‌اند، در حالی که سهم بیشتر موارد کریپتوسپوریدیوزیس انسانی را کریپتوسپوریدیوم پاروم و کریپتوسپوریدیوم هومینیس رقم می‌زند، نشان می‌دهد ریسک انتقال زئونوتیک کریپتوسپوریدیوم از سگ‌های ولگرد به انسان در مناطق مطالعه شده در این بررسی بالا نیست. با این وجود با توجه به اهمیت این تک یاخته در انسان‌های دارای نقص ایمنی، توجه به اقدامات پیشگیری کننده لازم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپوریدیوم، سگ ولگرد، ایران.

۱. گروه پاتو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲-۵. گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤول: ebrahimzade@um.ac.ir

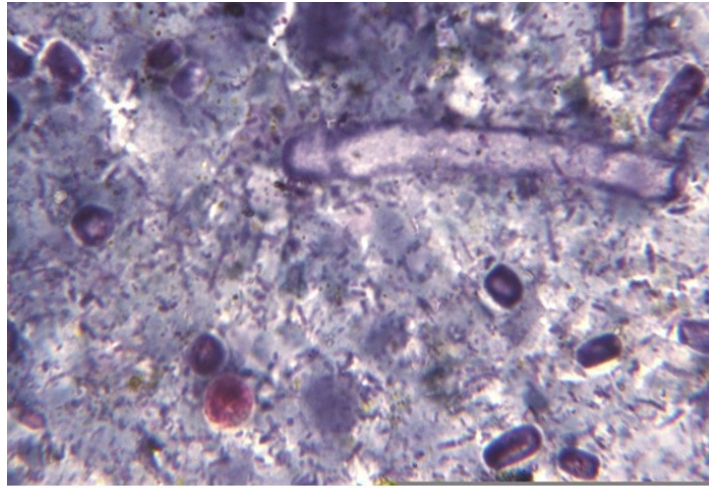
مواد و روش کار

روش‌های گوناگونی جهت تشخیص کریپتوسپورییدیوم معرفی شده است. تهیه گسترش از مدفوع و انجام رنگ آمیزی اختصاصی ذیل نلسون از ارزان‌ترین و ساده‌ترین روش‌ها می‌باشد (Jex و همکاران، ۲۰۰۸)، که در این روش تشخیص تک یاخته بر اساس شناسایی اووسیست در مدفوع صورت می‌گیرد. در بررسی حاضر از ۸۵ قلاده سگ ولگرد (۵۲ قلاده سگ نر و ۳۳ قلاده سگ ماده) در سنین ۶ الی ۱۲ ماه که بصورت تصادفی از استان‌های گیلان، مازندران و قزوین تهیه شده بودند، با آزمایش مستقیم رکتال نمونه مدفوع جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا نمونه‌های مدفوع را با روش فرمالین-اتر تغلیظ کرده، سپس از رسوب حاصله گسترش نازکی تهیه گردید و به روش ذیل نلسون اصلاح شده تحت رنگ آمیزی قرار گرفت، بدین منظور پس از خشک شدن گسترش‌ها در دمای آزمایشگاه، جهت ثابت شدن گسترش از الکل متیلیک به مدت ۵ دقیقه استفاده شد، سپس در کربول فوشین به مدت یک ساعت غوطه‌ور گردید، پس از شستشو با آب، نمونه‌ها در اسید الکل (اسید کلریدریک-اتانول) ۲/۵ درصد بین ۱۵ ثانیه تا ۱ دقیقه قرار داد شد در ادامه پس از شستشو در مالاتیت گرین به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت، در نهایت شستشو با آب انجام شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با درشت‌نمایی ۱۰۰ برابر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.

نتایج

در بررسی حاضر ۸۵ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از سگ‌های ولگرد با روش رنگ آمیزی ذیل نلسون مورد بررسی قرار گرفتند. در نمونه‌های رنگ شده تک یاخته کریپتوسپورییدیوم با اشکال گرد یا بیضی با اندازه ۴ تا ۶ میکرون که رنگ قرمز به خود گرفته بودند مشاهده شدند (شکل ۱)، در این تکنیک سایر اجزا مدفوع که غیر اسید فاست هستند بوسیله اسید الکل بی‌رنگ شده و رنگ سبز مالاتیت گرین به خود می‌گیرند، بنابراین سلول‌ها، باکتری‌ها و مخمرها به رنگ سبز در آمده و از کریپتوسپورییدیوم به راحتی قابل تفکیک هستند. از کل نمونه‌های جمع‌آوری شده فقط در یک نمونه مدفوع مربوط به سگ ولگرد ماده از استان گیلان آلودگی به این تک یاخته مشاهده شد. میزان شیوع کریپتوسپورییدیوم بین سگ‌های ولگرد تحت مطالعه ۱/۱ درصد گزارش گردید. میزان فراوانی آلودگی در بین دو جنس نر و ماده معنی‌دار نبود.

کریپتوسپورییدیوم تک یاخته‌ای کوکسیدیایی است که در تقسیم‌بندی جدید در فوق شاخه آلوتولتا (alveolates)، شاخه آپی-کمپلکسا، رده کونوئیداسیدا (Conoidasida)، راسته اوکوکسیدیوریدا (Eucoccidiorida) قرار می‌گیرد، که به عنوان یکی از علل مهم اسهال در انسان، به ویژه در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی و طیف وسیعی از حیوانات معرفی گردیده است. بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی ۳/۵ میلیارد نفر در معرض آلودگی و ۴۵۰ میلیون نفر که اکثراً کودک هستند به این عفونت انگلی مبتلا هستند (WHO، ۲۰۰۷). اووسیست‌های کریپتوسپورییدیوم همراه مدفوع حیوانات آلوده دفع شده و باعث آلودگی آب، غذا، خاک و محیط شده و در نهایت منجر به آلودگی انسان می‌شوند. راه انتقال کریپتوسپورییدیوم دهانی-مدفوعی و معمولاً از طریق بلع اووسیست همراه آب و غذای آلوده است (Burton و همکاران، ۲۰۱۱؛ Davies و Chalmers، ۲۰۱۰). هرچند شایع‌ترین گونه مشترک بین انسان و حیوان کریپتوسپورییدیوم پاروم می‌باشد ولی موارد کریپتوسپورییدیوزیس انسانی به علت کریپتوسپورییدیوم کانیس، کریپتوسپورییدیوم فلیس، کریپتوسپورییدیوم اندرسونی، کریپتوسپورییدیوم سوئیس تاکنون گزارش شده است (Zahedi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Ryan و Xiao، ۲۰۱۴). اووسیست‌های کریپتوسپورییدیوم بسیار مقاوم بوده و مواد ضدعفونی کننده متداول بر روی آن بی‌تأثیر است. ترکیبات شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز بر روی این انگل تأثیر نداشته و هیچ گونه واکسن پیشگیری‌کننده تجاری بر ضد این تک یاخته وجود ندارد. گزارشی مبنی بر توان شروع عفونت حتی توسط یک عدد اووسیست تک یاخته وجود دارد (Boulter-Bitzer و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bhat و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hunter و Nichols، ۲۰۰۲؛ Ramirez و همکاران، ۲۰۰۴). لذا با توجه به موارد فوق و مشترک بودن این تک یاخته بین انسان و حیوان لزوم توجه نسبت به این جرم وجود دارد. اکثر عفونت‌ها در سگ و گربه تحت بالینی است و سگ‌های مسن دفع اووسیست را بدون نشانه‌های بالینی انجام می‌دهند (Tilley و Smith، ۲۰۱۵). با توجه به اینکه کریپتوسپورییدیوم دارای طیف میزبانی وسیع می‌باشد و از میان این میزبان‌ها سگ‌ها ارتباطی تنگاتنگ با جوامع انسانی دارند، هدف مطالعه حاضر تشخیص تک یاخته کریپتوسپورییدیوم در سگ‌های ولگرد (به عنوان یکی از منابع آلوده‌سازی آب و غذای انسان به خصوص در جوامع روستایی) استان‌های قزوین، گیلان و مازندران می‌باشد.



شکل ۱. اووسیست کریپتوسپورییدیوم در رنگ آمیزی ذیل نلسون

بحث

قلاده سگ از استان گیلان آلودگی به کریپتوسپورییدیوم را نشان داد. در مورد آلودگی سگ‌های ولگرد به این تک یاخته گزارش چندانی وجود ندارد (Lucio-Forster و همکاران، ۲۰۱۰) نتیجه حاصل شده در این تحقیق تقریباً با اندک تفاوت‌هایی مشابه تحقیقات دیگر در سراسر جهان و ایران می‌باشد. میزان آلودگی سگ‌های ولگرد در بررسی حاضر با بررسی انجام شده بر روی ۱۹۱ قلاده سگ خانگی و ولگرد از استان تهران (۱۰/۵ درصد) با استفاده از روش رنگ آمیزی اورامین و ذیل نلسون همخوانی دارد (آل داود و اکبریان، ۱۳۸۴)، اما در مقایسه با بررسی کاکه خانی و همکاران در سال ۹۰ که میزان آلودگی سگ‌های ولگرد استان ایلام (۷/۱۴ درصد) را با استفاده از رنگ آمیزی مذکور بررسی کرده‌اند کمتر است. میزان آلودگی سگ‌های خانگی به کریپتوسپورییدیوم در تهران ۱/۶ درصد (دلیمی و همکاران، ۱۳۸۰)، ارومیه ۲/۹ درصد (توسلی و همکاران، ۱۳۸۹)، کرمان ۳ درصد (Mirzaei و Fooladi، ۲۰۱۳)، همدان ۳،۸ درصد (Gharekhani، ۲۰۱۴)، هلند ۸/۷ درصد (Overgaauw و همکاران، ۲۰۰۹)، ژاپن ۳/۹ درصد (Yoshiuchi و همکاران، ۲۰۱۰) گزارش گردیده است. مقایسه بررسی حاضر با سایر مطالعات نشان می‌دهد، میزان آلودگی نسبت به بررسی Casey Gaunt و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کانادا (۰/۴ درصد) بیشتر است (Casey Gaunt و Carr، ۲۰۱۱)، اما نسبت به بررسی Bahrami و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایلام (۷/۱۴ درصد) و همچنین بررسی Beiromvand و همکاران در سال ۲۰۱۳ در خراسان رضوی (۵ درصد) کمتر است. مطالعات اپیدمیولوژی صورت گرفته بر روی شیوع تک یاخته

کریپتوسپورییدیوم تک یاخته‌ای منتقله از طریق آب و غذا است که در پزشکی و دامپزشکی اهمیت زیادی دارد. قدم اولیه در بررسی هر جرم بیماری‌زا در هر منطقه بررسی وجود و شیوع آن در منطقه می‌باشد، سپس اقدامات لازم برای کنترل و پیشگیری بیماری حاصل از آن جرم انجام خواهد گرفت. تک یاخته کریپتوسپورییدیوم دارای طیف وسیع میزبانی بوده و دارای اهمیت زئونوتیک نیز می‌باشد. سگ به عنوان حیوانی که ارتباط نزدیکی با جوامع بشری دارد می‌تواند یکی از میزبان‌های مطرح در انتقال این تک یاخته به انسان باشد. انسان‌های دارای نقص سیستم ایمنی در برابر این تک یاخته آسیب پذیرند. تا کنون بیشتر بررسی‌های انجام شده درباره وجود و شیوع این تک یاخته در جمعیت سگ‌ها مربوط به سگ‌های خانگی بوده است. هر چند ارتباط سگ‌های خانگی با انسان بیشتر و نزدیک‌تر می‌باشد اما به دلیل کنترل و حساسیت‌های صاحب دام، کنترل بیشتری بر روی انتقال بیماری از این حیوانات به انسان وجود دارد. در حالی که سگ‌های ولگرد بدون هیچگونه کنترل می‌توانند باعث آلودگی آب و سیزیجات مورد مصرف انسان شوند، لذا در این مطالعه اقدام به بررسی وضعیت تک یاخته کریپتوسپورییدیوم در سگ‌های ولگرد گردید تا ریسک خطر انتقال این تک یاخته از جمعیت سگ‌های ولگرد به انسان‌ها مشخص گردد. در بسیاری از بررسی‌های انجام شده روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده به عنوان یک روش مناسب برای تشخیص اووسیست کریپتوسپورییدیوم در گسترش مدفوع به کار گرفته شده است. در مطالعه حاضر نیز از روش مذکور جهت بررسی مدفوع سگ‌های ولگرد استفاده گردید، که از این تعداد تنها یک نمونه (۱/۱ درصد) مدفوع مربوط به یک

کریبتوسپورییدیوم در سگ نشان می‌دهد که این میزان از ۰/۵ درصد در استرالیا، ۰/۶ درصد در انگلیس، ۲/۶ درصد در چین، ۶/۳ درصد در اسپانیا، ۷/۴ درصد در کانادا، ۴۴/۱ درصد در نروژ تا ۷۰ درصد در آمریکا متغیر است و میزان شیوع آلودگی این تک یاخته در سگ‌های جهان بین ۰/۵ تا ۷۰ درصد گزارش گردیده است (Lucio-Forster و همکاران، ۲۰۱۰).

بررسی مطالعات انجام گرفته بر روی این تک یاخته حاکی از آن است که شیوع این انگل در مناطق مختلف متفاوت است که می‌تواند دلیل آن شرایط جغرافیایی و آب و هوایی متفاوت در این مناطق باشد که بر روی چرخه زندگی انگل تأثیرگذار است (میرزایی، ۱۳۸۸). هر چند با توجه به عدم وجود روش‌های موثر جهت درمان و پیشگیری از آلودگی به این انگل، مقاومت اوویست به ضدعفونی‌کننده‌های متداول، و از طرفی امکان آلوده شدن سبزیجات و آب مورد مصرف

انسان توسط سگ‌های ولگرد بخصوص در مناطق روستایی و همچنین توان ایجاد آلودگی حتی با تعداد پایین اوویست، این تک یاخته انگلی می‌تواند یکی از مشکلات مهم بهداشت و سلامت عمومی محسوب گردد. اما با توجه به شیوع پایین این تک یاخته در سگ‌های ولگرد مناطق شمالی ایران و توجه به این نکته که سگ‌ها اکثراً به گونه کریبتوسپورییدیوم کنیس آلوده‌اند، در حالی که سهم بیشتر موارد کریبتوسپورییدیوزیس انسانی را کریبتوسپورییدیوم پاروم و کریبتوسپورییدیوم هومینیس رقم می‌زند نشان می‌دهد ریسک انتقال زئوتیک کریبتوسپورییدیوم از سگ‌های ولگرد به انسان در مناطق فوق بالا نیست. در عین حال با توجه به اهمیت بیماری در افراد دچار نقص سیستم ایمنی و کودکان به خانواده‌ها توصیه می‌شود که سبزیجات و میوه‌ها را قبل از مصرف به خوبی شستشو نمایند.



Survey of the *Cryptosporidium* infection among stray dogs in Ghazvin, Guilan and Mazandaran provinces

Ebrahimzade, E.^{1*}, khalili, S.², Fattahi, R.³, Gerami Sadeghian, A.⁴, Ahoo, M.B.⁵.

Received: 20.02.2017

Accepted: 14.07.2019

Abstract

Cryptosporidiosis is a gastro-intestinal disease that causes diarrhea or even death in immunodeficient humans and animals. In this study, 85 stray dogs (52 male and 33 female) faecal samples were randomly collected directly from rectum ranging of with ages between 6-12 month. *Cryptosporidium* oocysts were concentrated by using the formalin ether sedimentation method followed by the modified Ziehl-Neelsen staining technique. 1 out of 85 stool samples was positive for the presence of *Cryptosporidium*. The prevalence rate of cryptosporidiosis between stray dogs was 1.1%. The low outbreak of *Cryptosporidium* in stray dogs in the studied areas and the fact that dogs are mainly infected with *C. canis* unlike humans who are mostly infected with *C. parvum* and *C. huminis* indicate that the risk of transferring the disease from stray dogs to humans in this research isn't high. However, due to the importance of this protozoa in immunocompromised humans, preventive measures should be paid attention.

Keywords: *Cryptosporidium*, Stray dogs, Iran.

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2-5. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

*Corresponding author: eebrahimzade@um.ac.ir

آل داود، ج؛ اکبریان، ح. ۱۳۸۴. مروری بر کریپتوسپورییدیوم و کریپتوسپورییدیوز. انتشارات دنیای اندیشه، تهران، ایران.
 توسلی، م؛ جوادی، ش؛ سلطانعلی نژاد، ف؛ رسولی، س؛ اطمینان فر، ر. ۱۳۸۹. انگل‌های دستگاه گوارش سگ‌های دست آموز در شهرستان ارومیه. نشریه دامپزشکی. ۸۷، ۱۹-۲۴.
 دلیمی اصل، ح؛ مجرد خانقاه، س؛ جمشیدی، ش. ۱۳۸۰. انگل‌های گوارشی سگ‌های خانگی شهر تهران و بررسی میزان آگاهی صاحبان آنها در مورد خطر انتقال آلودگی انگلی سگ به انسان. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۴، ۱۳-۱۶.
 کاکه خانی، س؛ بهرامی، ع.ل؛ احمدی اسب چین، س؛ دوستی، ع.ز. ۱۳۹۰. مطالعه آلودگی‌های تک یاخته‌ای (ژیاردیا، انتاموبا، آیزوسپورا و کریپتوسپورییدیوم) در سگ ولگرد استان ایلام. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. ۳، ۱۳۲۵-۱۳۳۰.
 میرزایی، م. شیوع آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در سگ‌های ولگرد شهر کرمان در سالهای ۱۳۸۷-۱۳۸۶. مجله بهداشت و بیماری‌های دام. ۲، ۶۲-۵۵.

- Burton, A.J., Nydam, D.V., Jones, G. 2011. Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Vet Parasitol.* **175**, 178-181.
- Boulter-Bitzer, J.I., Lee, H., Trevors, J.T. 2007. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnol Advanc.* **25**, 13-44.
- Bhat, S.A., Juyal, P.D., Singla, L.D. 2012. Prevalence of cryptosporidiosis in neonatal buffalo calves in Ludhiana District of Punjab, India. *Asian J Anim Vete Advanc.* **7**, 512-520.
- Beiromvanda, M., Akhlaghia, L., Fattahi Massomb, H.S., Meamara, A.R., Motevalianc, A., Oormazdia, H., Razmjoua, E. 2013. Prevalence of zoonotic intestinal parasites in domestic and stray dogs in a rural area of Iran. *Prev Vet Med.* **109**, 162-167.
- Bahrami, A., Doošti, A., Nahravanian, H., Noorian, A.M. 2011. Epidemiological survey of gastro-intestinal parasites in stray dogs and cats. *Aust J Basic Appl Sci.* **5**(9), 1944-1948.
- Chalmers, R.M., Davies, A.P. 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol.* **124**(1), 138-146.
- Casey Gaunt, M., Carr, A. 2011. A survey of intestinal parasites in dogs from Saskatoon, Saskatchewan. *Can Vet.* **52**, 497-500.
- Gharekhani, J. 2014. Study On Gastrointestinal Zoonotic Parasites in Pet Dogs in Western Iran. *Parasitologica Turcica.* **38**(3), 172-176.
- Hunter, P.R., Nichols, G. 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* **15**, 145-154.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B. 2008. *Cryptosporidium*- Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv.* **26**, 304-317.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J., Cama, V., Xiao, L., Bowman, D. 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol.* **26**, 174-179.

- Mirzaei, M., Fooladi, M.** 2013. Coproscopy survey of Gastrointestinal parasites in owned dogs of Kerman city, Iran. *Vet Ital.* 49 (3), 309-313.
- Overgaauw, p., Zutphen, L.V., Hoek, D., Yaya, F., Roelfsema, J., Pinelli, E.** .2009. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet Parasitol.* **163**, 115–122.
- Ryan, U., Xiao, L.** 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease.* Vienna Springer. 3–41.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S.** 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection.* **6**, 773–785.
- Tilley, L.P., Smith, F.W.K.** 2015. *The 5-minutes veterinary consult canine & feline*, 6rd ed. 601-1171.
- World Health Organization(who). 2007. Partners for Parasite Control: Geographical Distribution and Useful Facts And Stats. Available from <http://www.who.int/wormcontrol/statistics/geographical/en/index.html>.
- Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimatad, I., Furuya, M., Tani, H., Sasai, K.** 2010. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet Parasitol.* **174**, 313–316.
- Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U.** 2016. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* **5(1)**, 88–109.