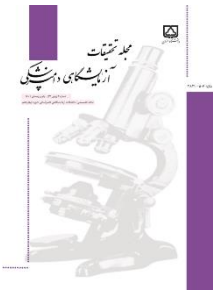

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 15(2023-24) 121-129

Phylogenetic study of *Hepatozoan canis* blood parasite in stray dogs of Guilan province

Malek, R.[1] , Rahimi, Z.[1], Javanbakht, H.[1*], Hadavi, M.[1].

Received: 29.04.2023 Accepted: 06.03.2024

Abstract

Reports in the literature indicate that species of *Hepatozoon canis* blood parasites are common in Iranian dog populations. In this study, we aimed to investigate the prevalence of *H. canis* infections and their phylogenetic relationships in dogs from an animal shelter in Guilan province using polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis.A total of 20 blood samples were subjected to PCR to amplify a fragment of 562 bp from the 18S rRNA gene of *Hepatozoon*spp. The PCR results showed that the *Hepatozoon* infection rate in the dogs was 10%. (2/20). Sequence analysis revealed that the *H. canis* found in this study was 100% matched to *H. canis*in in the NCBI GenBank database, which originated from a dog in Tehran (accession number KX880505) and a golden jackal in Romania (accession number KX712126). In the phylogenetic analysis, these three sequences are grouped in the same clade. This was the first study of dogs from Guilan province using molecular phylogenetic methods. There is a need for more comprehensive studies to determine the infection status in Iran.

Keywords: Protista, Apicomplexa, Dog, Tick, Parasite.

---

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
[*]**Corresponding author**: h.javanbakht@guilan.ac.ir.

مطالعه فیلوژنتیکی انگل خونی *Hepatozoon canis* در سگ های ولگرد استان گیلان

ملک، ر.[۱]، رحیمی، ز.[۱]، جوان بخت، ح.*[۱]، هادوی، م.[۱]

دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶

خلاصه

انگل خونی *Hepatozoon canis* در گزارشات متعدد به طور معمول در جمعیت-سگ های ایران گزارش شده است. در این مطالعه شیوع و روابط فیلوژنتیک آلودگی به انگل *H. canis* از یک پناهگاه حیوانات در استان گیلان توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و آنالیز توالی، مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، تکثیر قطعه ی ۶۰۰ نوکلئوتیدی از ژن *18SrRNA* در ۲۰ نمونه DNA استخراج شده از خون انجام شد و در۱۰ درصد نمونه ها نتایج واکنش PCR مثبت بود. آنالیز توالی های بدست آمده در این مطالعه نشان داد که ۱۰۰ درصد همانندی با توالی های *H. canis* بدست آمده از یک سگ در تهران (شماره دسترسی KX880505) و شغال طلایی از رومانی (شماره دسترسی KX712126) وجود دارد. در آنالیز فیلوژنتیکی این سه توالی در یک کلاد قرار گرفتند. این نخستین بررسی فیلوژنتیکی *H. canis* در سگ های استان گیلان بود. بررسی های جامع بیشتری برای شناسایی وضعیت آلودگی در استان های ایران مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: پروتیستا، آپی کمپلکسا، سگ، کنه، انگل.

---

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

*نویسنده مسئول: H.javanbakht@guilan.ac.ir

مقدمه

انگل های خونی مهره داران در سه گروه مهم قرار می گیرند: انگل های خونی تاژکدار، آپی کمپلکسا و نماتد های فیلاریایی که همه آنها سیکل زندگی دو یا چند میزبانه دارند (Davies و Johnston، ۲۰۰۰). پاتوژنهایی که توسط کنه ها منتقل می شوند به طور گسترده ای در دنیا، بخصوص در نقاطی که شرایط مناسب برای تکوین و چرخه زندگی کنه هایی مانند *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Ixodes* spp., و *Rhipicephalus* spp. وجود دارد توزیع شده است. این کنه ها می توانند انسان و سایر جانوران را در معرض گونه های مختلف انگل های خونی قرار دهند (Almazan و همکاران، ۲۰۲۲).

گونه های *Hepatozoon* spp انگل های خونی تک یاخته ای از شاخه آپی کمپلکسا خانواده Hepatozooidae هستند که طیف وسیعی از مهره داران از دوزیستان تا پستانداران را آلوده می کنند. تا کنون بیش از ۳۰۰ گونه از این انگل ها توصیف شده است که ۴۶ گونه از آنها برای پستانداران بیماریزا محسوب می شوند (Aydin و همکاران، ۲۰۱۵). *Hepatozoon canis* انگل خونی طیف وسیعی از گوشتخوران وحشی و خانگی را در دنیا محسوب می شود (Rubibi و همکاران، ۲۰۱۵). این انگل در پستاندران گلبول های سفید خونی بخصوص نوتروفیل و مونوسیت ها را آلوده می کند. مرحله تکثیر غیر جنسی این انگل در بافت های پارانشیم کبد، کلیه و طحال انجام می گیرد (Baneth و همکاران، ۲۰۰۳). *H. canis* در درجه اول توسط کنه های قهوه ای سگ از گونه *R.sanguineus* و بعد از خورده شدن اتفاقی کنه توسط سگ، طی هضم کنه های آلوده به اووسیت های رسیده انگل یا اسپورزوئیت های انگل به سگ ها انتقال می یابد. هر چند گونه های دیگری از کنه برای انتقال این انگل پیشنهاد شده است (Aktas، ۲۰۱۴). هپاتوزونوزیز سگ ممکن است با شدت آلودگی پایین ، کاملا بدون علامت باشد و با شدت آلودگی بالا به انگل،–بیماری با علایمی مانند تب، کم خونی، بی اشتهایی، اسهال و حتی مرگ ظاهر می شود (Otranto و همکاران، ۲۰۱۱).

در ایران مطالعاتی بر روی سگ ها و گربه ها صورت گرفته است که بیشتر این مطالعات شناسایی مورفولوژیکی مرحله گامونت در گلبول سفید، یا مرحله تکثیر شیزوگونی این انگل در بافت های پارانشیمی توسط روش های بافت شناسی بوده است (Zeinali و همکاران، ۲۰۲۲، Khoshnegah و همکاران، ۲۰۰۹). با توسعه روش های مولکولی، مطالعات ژنتیکی نیز جهت شناسایی دقیق تر انگل ها بکار گرفته شده است (Soltani و Dalimi، ۲۰۱۸). با توجه به اینکه یکی از مهمترین عوامل شیوع و شدت این انگل به پراکنش و فرکانس جمعیت ناقلین بستگی دارد و تفاوت های آب و هوایی و منطقه ای باعث تفاوت در شیوع ناقلین است (Otranto و همکاران، ۲۰۱۱) مطالعه ی پراکنش این انگل در نقاط مختلف کشور ضروری بنظر می رسد. در مطالعه حاضر حضور و شناسایی مولکولی انگل خونی *Hepatozoon* در جمعیتی از سگ های ولگرد در یک پناهگاه حیوانات در شرق استان گیلان مورد بررسی قرار گرفته است و همچنین مقایسه وضعیت فیلوژنتیکی این انگل و ارتباط با سایر انگل های *H. canis* گزارش شده در ایران هدف این مطالعه بوده است.

مواد و روش کار

نمونه برداری از ۲۰ قلاده سگ از یک پناهگاه در لاهیجان، استان گیلان انجام گرفت. در سگ ها علایم کلینیکی خاصی دیده نمی شد. از هر سگ چند قطره خون در اتانول مطلق برای مطالعات مولکولی اخذ گردید. استخراج DNA نمونه های خون توسط بافر دترجنت (Triton X- 100) انجام شد. توالی پرایمر بر اساس مطالعات قبلی قطعه ای از ژن *18 rRNA* در نواحی Hep300 (5′-GTT TCT GAC CTA TCA GCT TTC GACG-3′) و Hep900 (5′-CAA ATC TAA GAA TTT CACCTC TGA C-3′) تعیین شد که محصول تقریبا ۶۰۰ جفت باز از ژن *18SrRNA* را رونویسی می کند

(Ujvari و همکاران، ۲۰۰۴). واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر محلول حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکروگرم DNA الگو و غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر انجام شد. واکنش PCR شامل ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جدا شدن دو رشته DNA، در پی آن ۳۰ سیکل شامل جدا شدن دو رشته در ۴۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد و ساخته شدن رشته مکمل در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت اتصال نهایی رشته های مکمل در دما ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. نتایج PCR در ژل آگارز ۱.۲ درصد با نور UV مشاهده شد. توالی یابی محصول نهایی، توسط شرکت سینا کلون تهران انجام شد.

توالی 18SrDNA میتوکندریایی با استفاده از BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) تعیین هویت شد و با استفاده از برنامه BioEdit (v7. 2) ویرایش شد. برای آنالیز فیلوژنتیک، توالی پیدا شده در این آزمایش با توالی های دانلود شده در بانک ژنی با الویت نمونه های ایران مورد استفاده قرار گرفت. فاصله ژنتیکی توالی جدید با با نتایج NCBI توسط برنامه مگا (v5. 10) محاسبه شد . برای دقت بالاتر، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم (3. 2. Bayesian 1) و همچنین حداکثر احتمال با نرم افزار PhyML (v2.4.3s) و مدل TrN+G توسط نرم افزار Jmodel test (v2. 1. 10) به عنوان بهترین مدل تکاملی تعیین شد، انجام گرفت. درخت فیلوژنتیک توسط نرم افزار FigTree (v1. 3. 1) رسم شد.

نتایج

از مجموع ۲۰ نمونه خون تهیه شده از سگ ها، ۲ نمونه واکنش PCR مثبت برای انگل *Hepatoozon* داشتند و میزان آلودگی، برابر ۱۰ درصد محاسبه شد. با بررسی فاصله ژنتیکی بین ۲ توالی بدست آمده در این مطالعه مشخص شد توالی هر دو نمونه یکسان و متعلق به یک هاپلوتایپ بودند. مقایسه فاصله ژنتیکی توالی های فوق با سایر توالی های بانک ژنی نشان داد که انگل از گونه *Hepatozoon canis* می باشد. این انگل با هاپلوتایپ *H. canis* یک سگ در تهران (شماره دسترسی KX880505) و همچنین با هاپلوتایپی در شغال طلایی رومانی (شماره دسترسی KX712126) ۱۰۰٪ شباهت ژنتیکی داشت. بررسی روابط فیلوژنتیکی هاپلوتایپ انگل شناسایی شده با آنالیز فیلوژنتیکی و آنالیز بیسین، توپولوژی تقریبا یکسانی را نشان دادند. به طوری که هاپلوتایپ شناسایی شده در کنار دو توالی از هاپلوتایپ *H. canis* بدست آمده از تهران و رومانی در یک کلاد قرار گرفتند (شکل۱). این سه توالی مشابه به عنوان گروه خواهری با هاپلوتایپ های دیگر قرار گرفتند.

شکل ۱. رسم جایگاه توالی srRNA 18 بررسی شده در مطالعه حاضر در درخت فیلوژنتیکی انگل *H. canis* با استفاده از نرم افزار FigTree

بحث

یکی از دلایل اهمیت مطالعه ی انگل های آپی کمپلکسا، وجود برخی بیماری های ناشی از آن هاست که گاها به صورت اپیدمی بروز پیدا کرده و بر سلامت جمعیت انسانی تاثیر می گذارند و مانع توسعه ی اقتصادی می شوند، اگرچه خطر بیماری و مرگ می تواند با تست های تشخیصی دقیق و مقرون به صرفه به طرز چشم گیری کاهش پیدا کند (Li و همکاران، ۲۰۲۰). تشخیص، معمولا با آزمایش خون یا سایر مایعات بدن برای آنتی بادی ها یا DNA انگل (Srisutham و همکاران، ۲۰۱۷)، همچنین از طریق مشاهدات مستقیم انگل ها در بخشی از بافت ، اسمیر خون یا سایر مواد بیوپسی را شامل می شود (Sevilla و همکاران، ۲۰۱۸).

یافته ها بیان داشته اند که انگل های خونی چندمیزبانه آپی کمپلکسا، تنوع زیادی در انتخاب میزبان های خود دارند (Maia و همکاران، ۲۰۱۱). این مطلب نشان دهنده میزبان ویژگی پایین این انگل ها می باشد؛ به همین دلیل است که می توانند به سادگی میزبان های مختلفی انتخاب کنند. در مطالعات دیگری نشان داده شده که بعضی از گونه های *Hepatozoon* میزبان ویژگی بالایی از خود نشان می دهند. به طوری که نشان داده شده است جنس *Hepatozoon* علیرغم اینکه تمام گروه های مهره دار را آلوده می کنند ولی به طور خاص، با شیوع بالا و گونه های زیاد در خزندگان و پستانداران گزارش شده است (Valkiunas و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعه حاضر هاپلوتایپ بدست آمده با دو میزبان از رده سگ سانان در نقاط قاره های مختلف از جمله یک نمونه بررسی شده در استان تهران مشابهت داشت که نشان از میزبان ویژگی کم انگل، پراکنش وسیع ناقل یا ناقلین احتمالی و همچنین پراکنش و شیوع بالای این هاپلوتایپ از انگل در جهان دارد.

یک مطالعه انجام شده در برزیل، بر طبق مشاهده گامتوسیت ها در اسمیر خون، شیوع آلودگی متغیر از ۰/۵ ٪ تا ۳ ٪ نشان داد (Gondim و همکاران، ۱۹۹۸). در ایران اولین مطالعه با هدف برآورد مولکولی *H.canis* که در سال ۲۰۱۷ در استان اردبیل صورت گرفت، که شیوع *H.canis* ٪۲۳/۷ (۲۴ از ۱۰۴) گزارش شد (Dalimi و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه ی دیگر، نرخ شیوع عفونت گونه های *Hepatozoon* در ایران ٪۱/۵۷ (۴ از ۲۵۴) بدست آمد (Amoli و همکاران، ۲۰۱۲). در مطالعه دیگر سلطانی و دلیمی (۲۰۱۸) از طریق ردیابی ژنتیکی نشان دادن ٪۲۲ از نمونه های سگ در تهران آلوده به *H. canis* بودند. در مطالعه ای که بر روی AWDs (سگ های وحشی آفریقایی آزاد) از KNP(پارک ملی Kruger) در آفریقای جنوبی صورت گرفت، گامونت های *Hepatozoon* شبیه *H. canis* ٪ ۸۹/۷ (۲۶ از ۲۹) نمونه های اسمیر خون گزارش (Netherlands و همکاران، ۲۰۲۱). شیوع بالای گونه های *Hepatozoon* در AWDsآزاد در جاهای دیگر نیز گزارش شده است. در تانزانیا ٪ ۸۱/۵ (۱۳ از ۱۶) نمونه ها (Peirce و همکاران، ۱۹۹۵). و در زامبیا ٪ ۵۵ (۶ از ۱۱) نمونه ها (Williams و همکاران، ۲۰۱۴) آلوده بودند. در مطالعه حاضر، پس از بررسی ژنتیکی به کمک بخشی از ژن *18S rRNA* *Hepatozoon* sp. شناسایی که با توجه به بررسی های صورت گرفته به عنوان انگل *H. canis* تشخیص داده شد. میزان آلودگی به انگل با توجه به آنالیز ژنی ۲۰ درصد برآورد شد. تفاوت ها در شیوع *H. canis* می تواند به عواملی چون شرایط بدنی میزبان مهره دار، زیستگاه میزبان بی مهره، شرایط آب و هوایی منطقه، احتمال تقابل میزبان مهره دار و بی مهره آلوده به انگل و همچنین ارتباط میزبان های مهره دار با یکدیگر بستگی داشته باشد. هر یک از این عوامل می تواند به نوبه ی خود در تثبیت و انتقال عفونت انگلی موثر باشد (Netherlands و همکاران، ۲۰۲۱). شباهت صددرصدی توالی به دست آمده با توالی این انگل و نیز منطقه ی آن و نزدیکی به کشور، نشان دهنده ی فرآیندهای تکاملی انگل و میزبان در طی سالیان متمادی با توجه به شرایط اقلیمی و جغرافیایی ست. بررسی های بعدی می تواند با پرایمرهای اختصاصی تر، طول بیشتری از ژن *18S rRNA* را مورد ارزیابی قرار دهد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر، اولین بررسی مولکولی بر روی انگل های خونی پستانداران از جنس *Hepatozoon* در استان گیلان می باشد. بنظر می رسد مناطق مختلف ایران از جمله استان گیلان به دلیل شرایط مناسبی که برای ناقلین آپی کمپلکسا و به طور کلی سایر انگل های خونی دارد پتانسیل بالایی در گنجایش عفونت های انگلی دارد. لذا این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه گونه های انگلی موجود در منطقه، می تواند به افزایش اطلاعات ما در مورد این انگل در کشور کمک کند.

منابع

Amoli, A., Khoshnegah, A.R., Razmi, G.R. 2012. A Preliminary Parasitological Survey of *Hepatozoon* spp. Infection in Dogs in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Parasitology. **7 (4)**, 99-103.

Aktas, M. 2014. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. Veterinary Parasitology. **200**, 276–283.

Almazán, C., Scimeca R.C., Reichard, M.V., Mosqueda, J. 2022. Babesiosis and Theileriosis in North America. Pathogens. **11**, 168. https://doi.org/10.3390/pathogens11020168.

Aydin, M.F., Sevinc, F., Sevinc, M. 2015. Molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs from central part of Turkey. Tick Borne Disease. **6**, 388-392. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.004.

Baneth, G., Mathew, J.S., Shkap, V., Macintire, D.K., Barta, J.R., Ewing, S.A. 2003. Canine hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. Trends Parasitology. **19**, 27–31.

Dalimi, A., Jameie, F., Mohammadiha, A., Barati, M., Molaei, S. 2017. Molecular detection of *Hepatozoon canis* in dogs of Ardabil Province, Northwest of Iran. Archive of Razi Instute,.**72(3),**197-201.

Davies, A.J., Johnston, M.R.L. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibians and reptiles. Advances in Parasitology. **45**, 1–107.

Gondim, L.F., Kohayagawa, A., Alencar, N.X, Biondo, A.W., Takahira, R.K., Franco, S.R. 1998. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. Vetrinary Parasitology. **74(24)**:319–323. doi: 10.1016/S0304-4017(96)01120-X.

Khoshnegah, J., Mohri, M., Movassaghi, A.Z., Mehrjerdi, H.K. 2009. A Preliminary Parasitological Survey of *Hepatozoon* Spp. Infection in Dogs in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Parasitology. **7(4)**, 99-103.

Li, W., Yang, Y., Liu, Z.H., Zhao, Y.J., Zhang, Q., Zhang, L., Cheung, T., Xiang, Y.T. 2020. Progression of mental health services during the COVID-19 outbreak in China. International Journal of Biological Sciences. **16(10)**, 1732–1738. https://doi.org/ 10.1111/inm.12824.

Maia, J.P., Harris, D.J., Perera, A. 2011. Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. Journal Parasitology. **97**, 513–517.

Netherlands, E.C.,Stroebel, C., Louis, H., Preez, D., Shabangu, N., Matjila, T., Schalkwy, L.V ., Penzhorn, B.L. 2021. Molecular confirmation of high prevalence of species of *Hepatozoon* infection in free-ranging African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Kruger National Park, South Africa. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. **4**, 335-340.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Stanneck, D., Decaprariis, D., Capelli, G., Baneth, G. 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. Parasite &Vectors. **4**, 55.

Peirce, M., Laurenson, M., Gascoyne, S. 1995. Hepatozoonosis in cheetahs and wild dogs in the Serengeti ecosystem. African Journal of Ecology. **33**, 273–275.

Rubini, A.S., Mundim, A.V., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M.C., Baneth, G. 2014. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil, Research in Veterinary Science. **97**, 326-329.

Sevilla, E., González, L.M., Luque, D., Gray, J., Montero, E. 2018. Kinetics of the invasion and egress processes of *Babesia divergens*, observed by time-lapse video microscopy. Scientific Reports. **8**, 14116 | DOI:10.1038/s41598-018-32349-7.

Srisutham, S., Saralamba, N.T.,_Malleret, B., Renia, L. , Dondorp, A.D., Imwong, M. 2017. Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. PLoS ONE. **12(4),** e0175771. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175771.

Soltani , R., Dalimi, A. 2018. A Molecular Study on *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Tehran (Iran). Archives of Razi Institute. **73**(4), 257-263.

Valkiūnas, G Ilgunas, M., Bukauskaite, D.,Iezhova, T.A. 2016. Description of *Haemoproteus ciconiae* sp. nov. (Haemoproteidae, Haemosporida) from the white stork *Ciconia ciconia*, with remarks on insensitivity of established polymerase chain reaction assays to detect this infection. Parasitology Research. **115**, 2609–2616. Doi 10.1007/s00436-016-5007-4.

Williams, B.M., Berentsen, A., Shock, B.C., Teixiera, M.R., Dunbar, M.R., Becker, M.S., Yabsley, M.J. 2014. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia*, and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. Parasitology Research. **113**, 911–918.

Zeinali1, M.R., Malekifard, F., Rakhshanpour, A., Yakhchali, M. 2022. Study on *Hepatozoon canis* in dogs in Urmia region. Iranian Journal of Animal Science. **52**, (4), 253-260. DOI: 10.22059/ijas.2021.329716.653845. In Persian.