



شناسایی کنه‌های ناقل *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* در سگ‌های مناطق مختلف ایران

زهرا بحیرائی^۱، علیرضا سازمند^۱، علیرضا نوریان^۱ و دومینیکو اوترانتو^۲

۱- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

✉ donya1375.db@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7023-1029>

✉ alireza.sazmand@basu.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-8450-2993>

✉ nourian@basu.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-3567-8677>

۲- انستیتو انگل شناسی، دپارتمان دامپزشکی، دانشگاه باری آلدو مورو، ایتالیا

✉ domenico.otranto@uniba.it

<https://orcid.org/0000-0002-7518-476X>

چکیده: پیرو یافتن تک‌یاخته‌ی *Hepatozoon canis* و نماتود *Cercopithifilaria binae* در سگ‌های ایران، این مطالعه با هدف تشخیص ناقلین بالقوه‌ی این دو انگل در میان کنه‌های جمع‌آوری شده از سگ‌های ۵ استان ایران انجام شد. از مهر ماه ۱۳۹۷ تا خرداد ماه ۱۴۰۱ تعداد ۲۲۲ قلاده سگ صاحبدار و ۵۴۱ قلاده سگ ولگرد از استان‌های همدان (۳۰۵ قلاده)، کرمانشاه (۲۲۷ قلاده)، یزد (۸۰ قلاده)، خوزستان (۷۱ قلاده) و مازندران (۸۰ قلاده) جهت آلودگی به کنه مورد بررسی قرار گرفتند. کنه‌های جمع‌آوری شده (۳۳۳۹ عدد) از نظر ریخت‌شناسی شناسایی شده و کنه‌های بالغ با استفاده از روش‌های PCR معمولی (۱۱۹ کنه)، کالبدگشایی (۱۰۶ کنه) و بررسی میکروسکوپی اسلاید تهیه شده از مقاطع بافتی فرمالینه (۱۰۲ کنه) آزمایش شدند. در مجموع ۱۶۹ قلاده سگ (۲۲/۱٪) به کنه‌های سخت‌آلودگی داشتند. فراوانی آلودگی در همدان ۳۲/۴٪، کرمانشاه ۲۷/۳٪ و یزد ۱۰٪ بود در حالی که آلودگی در سگ‌های مورد بررسی در مازندران و خوزستان مشاهده نشد. اغلب کنه‌های نر جمع‌آوری شده متعلق به گونه‌ی *Rhipicephalus sanguineus* (۸۹/۳٪) و *Rhipicephalus turanicus* بودند اما یک قلاده سگ از همدان به ۲ کنه‌ی *Hyalomma asiaticum* (۱ نر و ۱ ماده) و ۱ کنه‌ی *Hyalomma excavatum* آلوده بود. طبق بررسی مولکولی فراوانی *Cercopithifilaria*، *Hepatozoon* و آلودگی هم‌زمان به هر دو انگل در کنه‌های *Rhipicephalus* به ترتیب ۱۴/۲۸٪، ۶/۱۷٪ و ۱/۶۸٪ بود. انگل‌های مورد مطالعه در کالبدگشایی و بررسی هیستولوژیک کنه‌ها مشاهده نشدند. نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی مؤید حضور *C. binae* و *H. canis* در کنه‌های گونه *Rh. turanicus* و *Rh. sanguineus* بود. نتایج این مطالعه مؤید آن است که هر دو گونه‌ی کنه در اپیدمیولوژی *Cercopithifilaria* و *Hepatozoon* در ایران نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: ایران، پاتوژن منتقله از ناقل، تک‌یاخته انگلی، ریپی‌سفالوس، کنه، نماتود فیلاریایی

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۲

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

دبیر تخصصی: علیرضا صبوری

Citation: Bahiraei, Z., Sazmand, A., Nourian, A. & Otranto, D. (2023) Identification of *Hepatozoon* and *Cercopithifilaria* in ticks infesting dogs from different regions of Iran. *J. Entomol. Soc. Iran* 43 (1), 35-45.

مقدمه

سگ‌ها می‌توانند به بیماری‌های انگلی مختلفی مبتلا شوند اما بیش‌تر پژوهش‌ها بر روی انگل‌های عامل بیماری مشترک با انسان تمرکز داشته و دارند. *Cercopithifilaria* (سرکوپیتی‌فیلاریا)، نماتود فیلاریایی است که به واسطه‌ی کنه‌های سخت‌منتقل شده و در بافت‌های زیر پوست پستانداران اهلی و وحشی زندگی می‌کند (Ramos et al., 2014; Maia et al., 2017). در سال‌های اخیر، این نماتود سگ‌سانان که میکروفیلر آن در پوست زندگی می‌کند توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. از آن‌جا که این میکروفیلرها در خون تشخیص داده نمی‌شود و تنها با بررسی میکروسکوپی نمونه تازه پوست قابل مشاهده هستند، گذشته مورد غفلت قرار گرفته بودند (Brianti et al., 2012). تاکنون سه گونه‌ی *Cercopithifilaria binae* (سرکوپیتی‌فیلاریا بینه)، *Cercopithifilaria grassi* (سرکوپیتی‌فیلاریا گراسی) و *Cercopithifilaria* sp. II sensu Otranto از سگ‌سانان اهلی و وحشی گزارش شده است (Ramos et al., 2014; Brianti et al., 2012; Uni et al., 2013; Ionică, et al., 2014). این انگل به تازگی و برای اولین بار در ایران از سگ‌های همدان، کرمانشاه، یزد، مازندران و اصفهان گزارش شده است (Sazmand et al., 2022). کنه‌های سخت (ایکسودیده Ixodidae) جنس *Rhipicephalus* (ریپی‌سفالوس) از جمله کنه‌ی قهوه‌ای سگ *Rhipicephalus sanguineus* (ریپی‌سفالوس سنگوینئوس) که گستردگی و فراوانی بالایی در سراسر جهان دارد به عنوان ناقل بیولوژیک این انگل شناخته شده‌اند (Ramos et al., 2014; Otranto et al., 2012; Brianti et al., 2012). اگرچه ناهنجاری‌های پاتولوژیکی که بتوان به طور قطع با حضور این

Corresponding author: Alireza Sazmand (E-mail: alireza.sazmand@basu.ac.ir)



میکروفیلر در پوست مرتبط دانست وجود ندارد (Otranto *et al.*, 2012)، اما آسیب‌های پوستی و پلی‌آتریت مزمن پراکنده بدون هیچ عامل آشکار دیگری در دو سگ آلوده به *C. bairae* مشاهده شده است (Gabrielli *et al.*, 2014)، در حالی که از یک سگ آلوده به *Cercopithifilaria* sp. تنها ضایعات پوستی زمخت گزارش شده است (Otranto *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2017). با وجود این که آسیب‌شناسی این میکروفیلر، به طور واضح تشخیص داده نشده است اما طبق یافته‌های بافت‌شناسی می‌توان انتظار تغییرات ادماتوزی خفیف و کانونی لایه‌های پوست و زیرپوست و نیز درماتیت بینابینی اطراف عروقی به دلیل حضور نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌ها را داشت (Ramos *et al.*, 2014).

تک‌یاخته‌های آپی‌کمپلکسایی جنس *Hepatozoon* (هپاتوزوئون) دارای بیش از ۳۰۰ گونه هستند (Dantas-Torres *et al.*, 2011) و به واسطه‌ی کنه‌های سخت از جمله اعضای جنس *Rhipicephalus* منتقل می‌شوند (Baneth *et al.*, 2007). هپاتوزوئونوزیس در سگ‌های مناطق مختلف جهان شایع بوده و توسط گونه‌های *Hepatozoon canis* (هپاتوزوئون کنیس) و *Hepatozoon americanum* (هپاتوزوئون امریکانوم) ایجاد می‌شود. *H. canis* پراکنش جهانی دارد و عمدتاً با کنه‌های *Rh. sanguineus* انتقال می‌یابد و دیگری *H. americanum* که تنها از قاره‌ی آمریکا گزارش شده است (De Miranda *et al.*, 2011). مرحله‌ی اسپوروگونی انگل در کنه اتفاق می‌افتد و سگ با بلع کنه‌ی آلوده، اووسیت *Hepatozoon* را وارد بدن خود می‌کند و مرحله‌ی گامتوگونی در لوکوسیت‌های حیوان کامل می‌شود (Baneth *et al.*, 2007; De Miranda *et al.*, 2011). این عفونت می‌تواند هنگام پارازیتی کم بدون علامت باشد اما در موارد شدید موجب تب، بی‌حالی، کم‌خونی و حتی مرگ می‌شود. *H. canis* تاکنون در سگ‌های استان‌های همدان، کرمانشاه، یزد، مازندران، خوزستان، خراسان و تهران گزارش شده- است (Amoli *et al.*, 2012; Soltani & Dalimi, 2018; Iatta *et al.*, 2021).

از آن‌جا که علی‌رغم گستردگی آلودگی به دو انگل *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* در سگ‌های کشور اطلاعاتی در مورد کنه‌های ناقل این انگل وجود نداشت، هدف از این مطالعه شناسایی کنه‌های ناقل این انگل‌ها در سگ‌های مناطق مختلف ایران با اقلیم‌های مختلف با استفاده از روش‌های میکروسکوپی، مولکولی و هیستولوژیکی بود.

مواد و روش‌ها

ملاحظات اخلاقی. مجوز تحقیق بر روی حیوانات طی مصوبات IR.BASU.REC.1399.014 و IR.UMSHA.REC.1398.124 کسب شد.

جمعیت مورد مطالعه. در بازه‌ی زمانی مهر ماه ۱۳۹۷ تا خرداد ماه ۱۴۰۱ جمعا ۷۶۳ قلاده سگ از شهرهای همدان (۳۰۵ قلاده)، کرمانشاه (۲۲۷ قلاده)، یزد (۸۰ قلاده)، آمل (۸۰ قلاده) و اهواز (۷۱ قلاده) برای آلودگی به کنه‌های سخت مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۱). بیشتر این سگ‌ها در پناهگاه‌های اداره شده توسط افراد و انجمن‌های غیر دولتی مردم‌نهاد مورد بازرسی قرار گرفتند (جدول ۱). اطلاعات مربوط به سن و جنس هر سگ ثبت گردیده و کنه‌های جمع‌آوری شده از هر سگ، درون ظروف پلاستیکی جداگانه به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی‌سینا منتقل شدند. در آزمایشگاه، کنه‌ها شمارش شده و با استفاده از کلیدهای تشخیصی معتبر مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفتند (Estrada-Peña *et al.*, 2017; Hosseini-Chegeni *et al.*, 2019; Walker *et al.*, 2000).

کالبدگشایی کنه‌ها. تا حد امکان بنا بر تعداد کنه‌های اخذ شده از هر حیوان (ترجیحا ماده‌های نیمه خون‌خورده) ۱ الی ۵ کنه انتخاب شدند (Manoj *et al.*, 2020). کنه‌ها به پشت روی اسلاید شیشه‌ای ثابت شده و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. جهت بهبود مشاهده‌ی مراحل تکاملی انگل‌های *Cercopithifilaria* و *Hepatozoon* از یک قطره نرمال سالین و متیلن‌بلو ۱٪ استفاده شد. اسلایدهای حاصله با استفاده از میکروسکوپ نوری و استریومیکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ تا ۴۰۰ برابر بررسی شدند (O'Dwyer *et al.*, 2011; Brianti *et al.*, 2012).



شکل ۱- نقشه‌ی ایران نشان‌دهنده‌ی مناطق نمونه‌گیری شده

Fig. 1. Map of Iran showing the sampling localities

جدول ۱- ساختار جمعیتی سگ‌های (n=۷۶۳) مورد آزمایش در این مطالعه

Table 1. Population structure of examined dogs (n=763) in this study

CITY	SHELTERED DOG	PET DOG
HAMEDAN	33.44% (102/305)	66.23% (202/305)
KERMANSHAH	91.18% (207/227)	8.82% (20/227)
YAZD	100% (80/80)	0%
AMOL	100% (80/80)	0%
AHVAZ	100% (71/71)	0%

تهیه‌ی مقاطع بافتی از کنه‌ها و بررسی هیستولوژی. تعداد ۱۰۲ کنه از سگ‌های همدان و کرمانشاه (۱ تا ۵ کنه ترجیحا ماده کامل خون خورده) انتخاب و پاها از ناحیه نزدیک به کوکسا با استفاده از تیغ بیستوری قطع شده و کنه‌ها در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شدند. پس از تثبیت به مدت حداقل ۴۸ ساعت، هر کنه به صورت عرضی به قطعاتی با ضخامت حدود ۲ میلی‌متر برش داده شد. عمل‌آوری بافتی شامل مراحل آبگیری با استفاده از غلظت‌های صعودی اتانول، شفاف‌سازی با زایلن و آغستگی با پارافین طبق روش‌های متداول انجام گردید. پس از قالب‌گیری، بلوک‌ها به وسیله دستگاه میکروتوم به ضخامت ۵-۶ میکرومتر برش داده شده و برش‌های بافتی به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی گردید. نواحی مختلف بدن کنه‌ها از جمله درم برای حضور لاروهای در حال رشد (Petit et al., 1988) و هم‌چنین محوطه‌ی عمومی برای حضور لارو کرم و اووسیست *Hepatozoon* بررسی شد (Murata et al., 1995). اسلایدهای تهیه شده با استفاده از یک دستگاه میکروسکوپ نوری (CX41, Olympus, Japan) مجهز به دوربین دیجیتال (DP25, Olympus, Japan) با درشت‌نمایی‌های ۴۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفته و تصویربرداری شدند.

استخراج DNA ژنومیک از کنه‌ها. استخراج با روشی مبتنی بر فنل-کلروفرم انجام شد (Lade et al., 2014). کیفیت DNAهای استحصال شده با روش الکتروفورز بر روی ژل ۰/۸ درصد و نیز دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) مورد ارزیابی قرار گرفته و پس از تاییدات لازم تا زمان استفاده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

واکنش PCR برای شناسایی انگل‌ها. برای شناسایی مولکولی *Cercopithifilaria* نمونه‌ها ابتدا با جفت پرایمر COInt F/COInt R که قادر است فیلاریوئیدهای مختلف را شناسایی کند مورد پایش قرار گرفته و محصول PCR اولیه در نمونه‌های مثبت با پرایمرهای اختصاصی جنس *Cercopithifilaria* یعنی Cbcox/NTR آزمایش شدند. برای شناسایی مولکولی *Hepatozoon* ابتدا از جفت پرایمر BTH. 1F/BTH. 1R که انگل‌های جنس *Babesia*، *Theileria* و *Hepatozoon* را شناسایی می‌کند مورد پایش قرار گرفته و نمونه‌های مثبت با پرایمرهای اختصاصی H14Hepa18SFw/H14Hepa18SRv مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). همه‌ی واکنش‌های PCR در ترموسایکلر (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) SimpliAmp™ در حجم ۲۰ میکرولیتر که به ازای هر نمونه، ۱۱ میکرولیتر مستر میکس تجاری حاوی آنزیم تک پلیمرز (DNA Taq Polymerase 2X Mastermix, Ampliqon, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومولی (به استثنای Cbcox/NTR که از غلظت ۱۰۰ پیکومولی پرایمر استفاده شد)، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر DNA یا محصول PCR انجام شد. در هر واکنش از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و خون سگ آلوده به *H. canis* از یک مطالعه قبلی (Iatta et al., 2021) و برای *Cercopithifilaria* هم نمونه پوست آلوده از یک مطالعه قبلی دیگر (Sazmand et al., 2022) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. برای آنالیز محصولات PCR از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت، به مدت ۷۰ تا ۸۵ دقیقه و در بافر TAE 1X (-Tris-acetate) Transilluminator, (Vilber Lourmat, France) تصویربرداری شد.

توالی‌یابی و بررسی فیلوژنتیک. تعدادی از محصولات PCR متعلق به هر دو انگل که در الکتروفورز سیگنال‌های قوی نشان دادند، برای توالی‌یابی به شرکت زیست فناوری پیشگام (پیشگام بیوتک، تهران، ایران) ارسال و مورد خوانش دوطرفه قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR پس از اصلاح با نرم‌افزار SnapGene نسخه ۵.۳ (GSL Biotech, LLC, USA) و استفاده از BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت درخت‌چه‌ی تبارزایی (Phylogenetic tree) مربوطه به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ (Kumar et al., 2016) رسم گردید. توالی همولوگ از *Dirofilaria immitis* (accession no. KP760184) برای *Cercopithifilaria* و از *Theileria bicornis* به عنوان گروه خارجی برای *Hepatozoon* استفاده شد.

تجزیه آماری داده‌ها. مقایسه شیوع انگل‌ها در کنه‌های مختلف، شهر، فصل و جنسیت سگ با آزمون مربع کای و مقایسه میانگین سنی سگ‌های دارای کنه‌های آلوده به انگل‌های هدف، توسط تجزیه واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه داده‌ها در سطح ۵ درصد اطمینان در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (Armonk, NYBIM Corp, USA) انجام شد.

نتایج

شمارش و تشخیص مورفولوژی کنه‌ها. از ۷۶۳ قلاده سگ مورد بررسی ۱۶۹ قلاده آلوده به کنه‌ی سخت بوده و ۳۳۳۹ کنه از آن‌ها جدا شد (جدول ۳). طبق کلیدهای تشخیصی موجود تمامی کنه‌های ماده، نمف و لارو از جنس *Rhipicephalus* تشخیص داده شدند.

جدول ۲- پرایمرهای استفاده شده و ژن‌های مورد هدف در این مطالعه

Table 2. Primers and target genes used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Target pathogen	Target gene	Amplicon size (bp)	Ref.
Nest 1	COIint F COIint R	TGATTGGTGGTTTGGTAA ATAAGTACGAGTATCAATATC	Filarial nematodes	cox1	650-670 (Casiragh et al., 2001)
Nest 2	Cbcox1 F NTR	CGGGTCTTTGTTGTTTATTGC ATAAGTACGAGTATCAATATC	Cercopithifilaria	cox1	304 (Latrofa et al., 2012)
BTH. 1F BTH. 1R	CCTGMGARACGGCTACCACATCT TTGCGACCATACTCCCCCA	Apicomplexa	18S rRNA	561	(Hodžić et al., 2015)
H14Hepa18SFw H14Hepa18SRv	GAAATAACAATACAAGGCAGTAAAA TGCT GTGCTGAAGGAGTCGTTTATAAAGA	Hepatozoon	18S rRNA	620	(Zintl et al., 2011)

از تعداد ۱۱۰۱ کنه‌ی نر، ۱۱۴ کنه *Rb. turanicus* (۱۰/۳٪) و ۹۸۴ کنه *Rb. sanguineus* (۸۹/۳٪) تشخیص داده شدند. به علاوه یک قلاده سگ از همدان به ۳ کنه‌ی *Hyalomma* شامل ۱ کنه‌ی نر *Hyalomma excavatum*، ۱ کنه‌ی نر *Hyalomma asiaticum* و ۱ کنه‌ی ماده‌ی *H. asiaticum* آوده بود. نتایج کالبدگشایی. در این مطالعه ۱۰۶ کنه از همدان (۶۸ کنه) و کرمانشاه (۳۸ کنه) کالبدگشایی شدند. که از این بین ۲۲ کنه نر، ۲۷ کنه نمف و ۵۷ کنه ماده بودند (خون نخورده $n=۲$ ، نیمه خون خورده $n=۴۸$ ، کاملاً خون خورده $n=۷$). طی بررسی اسلاید حاصل از کالبدگشایی هیچ یک از مراحل تکاملی *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* مشاهده نشد.

نتایج مولکولی. PCR بر روی ۱۱۹ نمونه DNA استخراج شده انجام و نتایج مثبت با توجه به باندهای به دست آمده در ژل الکتروفورز گزارش شدند (جدول ۴). محصول واکنش PCR در مورد *Cercopithifilaria* در Nest 2 با استفاده از پرایمرهای Cbcox1 F و NTR ۳۰۴ جفت باز و محصول PCR در مورد *Hepatozoon* با استفاده از پرایمرهای H14Hepa18SFw و H14Hepa18SRv ۶۲۰ جفت باز بود (شکل ۲). از بین نمونه‌های مورد بررسی ۸ نمونه (۶/۷٪) به *Cercopithifilaria*، ۱۷ نمونه (۱۴/۲٪) به *Hepatozoon* و ۲ نمونه (۱/۷٪) آلودگی همزمان به هر دو انگل را نشان دادند.

نتایج توالی‌یابی و بررسی فیلوژنتیک. تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدهای جدایه‌های *Cercopithifilaria* (براساس یک توالی جزئی ۳۰۴ bp) از ژن *cox1* و *Hepatozoon* (بر اساس یک توالی جزئی از ژن *18S rRNA*) به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر و دیگر جدایه‌های انگل‌ها از میزبانان و ناقلین در مناطق مختلف جهان واجد ارتباط فیلوژنتیکی نشان داده شد.

مقایسه توالی‌های *Cercopithifilaria* در مطالعه‌ی حاضر با گونه‌های دیگر *Cercopithifilaria* در بلاست نشان داد که توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های *Cercopithifilaria* در مطالعه‌ی حاضر با گونه‌ی *C. binae* جدا شده از کنه‌ی *Rb. sanguineus* مورد مطالعه در یونان (MT365663.1)، *Canis lupus familiaris* (سگ) در ایالات متحده آمریکا (MH390716.1) و *C. lupus familiaris* (سگ) در ایتالیا (JF461457.1) همانندی ۱۰۰٪ داشت. بلاست همچنین نشان داد جدایه‌های *Hepatozoon* در مطالعه‌ی حاضر با گونه‌ی *H. canis* جدا شده از *Vulpes vulpes* (روباه قرمز) در فرانسه (MK673834.1)، *C. lupus familiaris* (سگ) از رومانی (OP412819.1) و *Rb. sanguineus* از ترکیه (OL780793.1) همانندی ۱۰۰٪ دارد. توالی‌های به دست آمده در مطالعه‌ی کنونی به شماره دسترسی (Cercopithifilaria) OQ918292 و به شماره دسترسی (Hepatozoon) OQ918265 در بانک ژن به ثبت رسیدند.

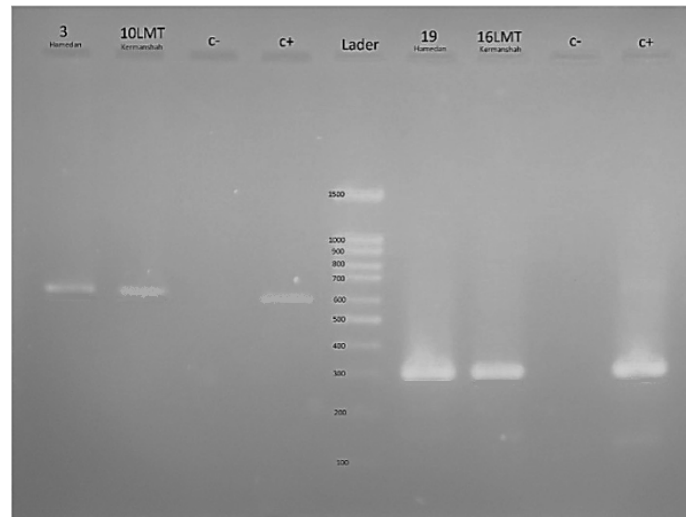
نتایج هیستولوژی. در بررسی میکروسکوپی ۱۰۲ مقطع بافتی تهیه شده از کنه‌ها میکروفیلر *Cercopithifilaria* و اوویست *Hepatozoon* مشاهده نشد.

نتایج آماري. بین حضور پاتوژن و شهر نمونه‌گیری شده و نیز بین حضور پاتوژن و ماه نمونه‌گیری رابطه‌ی معناداری در سطح ۰/۰۵ وجود داشت. بدین صورت که فراوانی بیش‌تری از *Cercopithifilaria* در کنه‌های جمع‌آوری شده از سگ‌های همدان و فراوانی بیش‌تری از *Hepatozoon* در کنه‌های جمع‌آوری شده از سگ‌های کرمانشاه مشاهده شد. به علاوه *Cercopithifilaria* در کنه‌های جمع‌آوری شده در فصل پاییز و *Hepatozoon* در کنه‌های جمع‌آوری شده در فصل تابستان فراوانی بیش‌تری دارد.

جدول ۳- فراوانی آلودگی سگ‌ها به مراحل مختلف زندگی کنه در شهرهای مختلف ایران

Table 3. Infestation rate of dogs from different cities of Iran according to life stages of ticks

CITY	INFESTED / EXAMINED DOGS (%)	COLLECTED TICKS	FEMALE	MALE	NYMPHS	LARVAE
HAMEDAN	99 / 305 (32.4%)	1416	432	702	256	33
KERMANSHAH	62 / 227 (27.3%)	1844	419	359	1025	41
YAZD	8 / 80 (10.0%)	79	39	40	0	0
AHVAZ	0 / 71 (0%)	-	-	-	-	-
AMOL	0 / 80 (0%)	-	-	-	-	-
TOTAL	169 / 763 (22.1%)	3339	890	1101	1281	74



شکل ۲- نتیجه ژل آگارز نمونه‌های PCR شده، نمونه‌های شماره‌ی 3 (همدان) و شماره‌ی 10LMT (کرمانشاه) باند محصول ۶۵۰ جفت‌بازی مربوط به جنس *Hepatozoon* و نمونه‌های شماره‌ی 19 (همدان) و 16LMT (کرمانشاه) باند محصول ۳۰۴ جفت‌بازی مربوط به جنس *Cercopithifilaria* را نشان می‌دهند. C+: کنترل مثبت (*Hepatozoon canis* و *Cercopithifilaria binae*)، C-: کنترل منفی (آب مقطر)، Ladder: لدر ۱۰۰ bp.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Ticks #3 (from Hamedan) and #10LMT (from Kermanshah) show 650 bp band of *Hepatozoon* sp., and #19 (from Hamedan) and #16LMT (from Kermanshah) show 304 bp band of *Cercopithifilaria* sp.. Lane C+: Positive control (*Cercopithifilaria binae* and *Hepatozoon canis*), lane C-: Negative control (DW), lane ladder: A 100 bp ladder.

بحث

مطالعه‌ی حاضر نقش کنه‌های *Rh. turanicus* و *Rh. sanguineus* را در اپیدمیولوژی انگل‌های *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* در ایران نشان داد. بدین ترتیب که در بین کنه‌های *Rh. sanguineus* مورد بررسی ۹۰٪ به *Cercopithifilaria* و ۳٪ به *Hepatozoon* آلوده بودند. همچنین از میان کنه‌های *R. turanicus* ۱۸٪ کنه‌ها آلوده به *Cercopithifilaria* و ۳٪ کنه‌ها آلوده به *Hepatozoon* بودند. اگرچه هر دو گونه‌ی *Rh. sanguineus* و *Rh. turanicus* به عنوان میزبانان واسط اصلی برای انگل‌های *H. canis* و *C. binae* شناخته شده‌اند (Sazmand et al., 2022; Giannelli et al., 2017; Baneth et al., 2001) از آن جایی که آزمایشات PCR مطالعه‌ی حاضر روی DNAی تمام بدن کنه‌ها انجام گرفت یافتن ژنوم انگل ممکن است ناشی از محتویات لوله گوارش کنه و حاصل خون-خواری باشد و نه لزوماً مراحل تکاملی انگل‌ها (Shamshiri et al., 2022) چرا که در یک مطالعه‌ی پیشین بر روی سگ‌های همدان و کرمانشاه فراوانی *Hepatozoon* ۱۸/۵٪ (۱۵ از ۸۱ قلابه) و ۷۸/۴٪ (۴۰ از ۵۱ قلابه) بوده است (Iatta et al., 2021). در یک مطالعه‌ی دیگر بر روی سگ‌های همدان و کرمانشاه با بررسی نمونه‌های پوست سگ‌ها میزان فراوانی انگل *Cercopithifilaria* در همدان ۵/۶٪ (۷ از ۱۲۵ قلابه)، کرمانشاه ۲۵٪ (۱۲ از ۴۸ قلابه) بوده است (Sazmand et al., 2022). لذا نمی‌توان به صورت قطع بیان نمود که این کنه‌ها میزبان واسط انگل‌های مورد بررسی بوده‌اند. اما با توجه به نتایج مثبت کنه‌های نر از هر دو گونه‌ی *Rhipicephalus* برای هر دو گونه‌ی *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* احتمال نقش میزبان واسطی این کنه‌ها افزایش می‌یابد چرا که کنه‌های نر معمولاً خون‌خواری انجام نمی‌دهند.

نتایج بررسی فیلوژنتیک نمونه‌های بررسی شده نشان داد میکروفیلرهای به دست آمده از گونه‌ی *C. binae* بودند. *C. binae* شایع‌ترین گونه این جنس در سگ‌ها در مناطق مختلف جهان می‌باشد و در یک مطالعه‌ی قبلی بر روی سگ‌های پنج استان کشور (همدان، کرمانشاه، یزد، آمل، اهواز) تنها یک هاپلوتایپ *C. binae* شناسایی گردید (Sazmand et al., 2022) اما دو گونه‌ی دیگر نیز البته با فراوانی کم‌تر سگ‌ها را مبتلا می‌نماید که شامل *Cercopithifilaria* sp. II و *Cercopithifilaria grassii* می‌باشند (Otranto et al., 2013). اگرچه گزارشی از بروز دو گونه کرم مذکور در غرب آسیا نیز وجود ندارد اما به طور مثال DNAی *C. grassii* از یک کنه‌ی *Rhipicephalus* sp. III در پاکستان (Latrofa et al., 2012) و نیز *Rh. sanguineus* در هند شناسایی شده است (Bezerra-Santos et al., 2022).

همچنین *Cercopithifilaria* sp. II در سگ‌ها و کنه‌های *Rh. sanguineus* جدا شده از آن‌ها در یونان گزارش شده است (Angelou et al., 2020). مطالعات پیش‌تر بر روی سگ‌سانان اهلی و وحشی و کنه‌های آن‌ها در ایران می‌تواند اطلاعات بیش‌تری در مورد گونه‌های *Cercopithifilaria* موجود در کشور فراهم نماید. همچنین تجزیه فیلوژنتیک نمونه‌های بررسی شده جنس *Hepatozoon* نشان داد انگل‌های به دست آمده از گونه‌ی *H. canis* بودند. در یک مطالعه‌ی مولکولی بر روی خون سگ‌ها در ایران که انگل *Hepatozoon* فراوانترین پاتوژن از میان تمامی میکروب‌های مورد بررسی بود، سگ‌های شهرهای همدان ۱۸/۵٪ (۱۵/۸۱)، کرمانشاه ۷۸/۴٪ (۴۰/۵۱)، اهواز ۴۹/۳٪ (۳۴/۶۹)، یزد ۱۹/۲٪ (۱۵/۷۸) و آمل ۴۲/۷٪ (۳۲/۷۵) آلوده به *H. canis* گزارش شدند (Iatta et al., 2021). در آن تحقیق پنج ساب‌تایپ (ST) از *H. canis* در مناطق مختلف ایران مورد شناسایی قرار گرفت (Iatta et al., 2021). البته ممکن است ساب‌تایپ‌ها و هاپلوتایپ‌های دیگری از انگل‌های *H. canis* و *C. binae* نیز در کشور وجود داشته باشند که نیازمند مطالعات تکمیلی آینده است.

جدول ۴- تعداد و درصد DNAهای کنه‌های مخلوط شده که از لحاظ آلودگی به *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* آزمایش و آلوده تشخیص داده شدند طبق متغیرهای مختلف

Table 5. Number and percentage of pooled tick DNAs ($n = 119$) positive for DNA of *Cercopithifilaria* sp., *Hepatozoon* sp. and mixed infection according to different variables

PATHOGENS GROUPS		POOLED DNA (%)	CERCOPITHIFILARIA (%)	HEPATOZOON (%)	MIXED INFECTION (%)	P VALUE
TICK	Larvae	1/119 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.75
	Nymph	11/119 (9.2)	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	
	<i>Rhipicephalus</i> ♀	77/119 (64.7)	4 (3.4)	8 (6.7)	0 (0)	
	<i>Rh. sanguineus</i> ♂	16/119 (13.4)	1 (0.8)	4 (3.4)	1 (0.8)	
	<i>Rh. turanicus</i> ♂	15/119 (12.6)	2 (1.7)	4 (3.4)	0 (0)	
CITY	Hamedan	40/119 (33.6)	5 (4.2)	2 (1.7)	2 (1.7)	0.03
	Kermanshah	72/119 (60.5)	2 (1.7)	15 (12.6)	0 (0)	
	Yazd	7/119 (5.9)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	
SEASON	Spring	4/119 (3.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.02
	Summer	92/119 (77.3)	2 (1.7)	16 (13.4)	1 (0.8)	
	Autumn	16/119 (13.4)	5 (4.2)	1 (0.8)	1 (0.8)	
	Winter	7/119 (5.9)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	
SEX	Male	42/119 (42.4)	2 (1.7)	5 (4.2)	0 (0)	0.76
	Female	57/119 (57.6)	4 (3.4)	9 (7.6)	2 (1.7)	
	No information	20/119 (16.8)	2 (1.7)	3 (2.5)	0 (0)	
AGE	under 1 year	38/119 (31.9)	1 (0.8)	4 (3.4)	1 (0.8)	0.25
	1-2 years	27/119 (22.7)	2 (1.7)	7 (5.9)	0 (0)	
	2-3 years	8/119 (6.7)	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	
	over 3 years	8/119 (6.7)	1 (0.8)	2 (1.7)	0 (0)	
	No information	38/119 (31.9)	3 (2.5)	3 (2.5)	0 (0)	

علی‌رغم کالبدگشایی ۱۰۶ کنه و بررسی مقاطع بافتی ۱۰۲ کنه جهت یافتن *Hepatozoon* و *Cercopithifilaria* مراحل تکاملی هیچ‌یک از انگل‌ها یافت نشد. تاکنون مطالعات کمی در زمینه‌ی جست‌وجوی میکروسکوپی مراحل تکاملی لارو *Cercopithifilaria* در کنه‌ها و اوویست *Hepatozoon* در کنه‌ها انجام شده است. در طی مطالعه‌ای در برزیل ۸ اوویست اسپوروله‌ی *H. canis* از همولف یک کنه‌ی ماده‌ی نیمه‌خون‌خوردی *Rhipicephalus microplus* با روش میکروسکوپی تشخیص داده شد (De Miranda et al., 2011). در پژوهشی دیگر ۷۵۸ کنه‌ی *Rh. sanguineus* از ۷۵ سگ در شرق برزیل جهت جست‌وجوی میکروفیلر *Cercopithifilaria* و اوویست *Hepatozoon* کالبدگشایی شدند که به ترتیب ۷ کنه (۰/۹۸٪) و ۴ کنه (۰/۵۳٪) آلوده گزارش شدند (Santos et al., 2018). اما در یک بررسی دیگر بر روی ۶۳۳ کنه جداشده از سگ‌های ایتالیا، اسپانیا و یونان ۷۰ نمونه (۱۱/۰۵٪) آلوده به *Cercopithifilaria* گزارش شدند (Otranto et al., 2012). در حدود یک دهه پیش مراحل تکاملی *Cercopithifilaria* در نمف‌های کنه‌ی *Rh. sanguineus* که از یک سگ آلوده به *Cercopithifilaria* تغذیه کرده بودند، طی ۵ فاصله‌ی زمانی مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۲۷۰ نمف خونخواری کرده‌ی جمع‌آوری شده، ۲۰۰ مورد کالبدگشایی شدند که از این میان ۱۰ مورد (۵٪) آلوده به میکروفیلر *Cercopithifilaria* بودند (Brianti et al., 2012). به نظر می‌رسد برای یافتن اوویست *Hepatozoon* و میکروفیلر *Cercopithifilaria* در کنه‌ها به ویژه از حیوانات بدون سابقه‌ی عفونت، نیاز به کالبدگشایی و تهیه‌ی مقاطع بافتی از تعداد کنه‌های بسیار زیادی باشد. از ۷۶۳ قلاده سگ مورد مطالعه در این تحقیق، میزان فراوانی آلودگی سگ‌ها در شهرهای همدان ۳۲/۴٪، کرمانشاه ۲۷/۳٪ و یزد ۱۰/۰٪ بود. اگرچه سگ‌های ساکن پناهگاه‌های شهرهای آمل و اهواز به دلیل مدیریت صحیح فاقد کنه بودند اما تاکنون میزان فراوانی متغیری از آلودگی به کنه‌ی *Rh. sanguineus* در سگ‌های شهرهای مختلف ایران از جمله شیراز ۳۰/۷٪ (Jafari-Shoorijeh et al., 2008)، ایلام ۲۹/۳۹٪ (Bahrami et al., 2012)، اهواز ۷/۱۴٪ (Mosallanejad et al., 2012)، مشکین شهر ۳۲/۱۹٪ (Khazeni et al., 2013)، تهران ۳۶/۴٪ (Jamshidi et al., 2012)، شمال و مرکز ایران ۰/۷٪ (Ebrahimzade et al., 2016) و گیلانغرب کرمانشاه ۲۶/۱۶٪ (Mirani et al., 2017) گزارش شده است. در این پژوهش ۸۹/۳٪ کنه‌های *Rh. sanguineus* و ۱۰/۳٪ آن‌ها *Rh. turanicus* شناسایی شدند. کنه‌ی *Rh. turanicus* که شباهت ریخت‌شناسی زیادی با *Rh. sanguineus* دارد بیش‌تر از ۱۴ قلاده از ۴۶۰ قلاده سگ مورد معاینه در مشهد شناسایی و گزارش شده بود (Minabaji et al., 2020). کنه‌ی *Rh. sanguineus* که از زمان باستان نیز سگ‌ها را آلوده کرده است (Otranto et al., 2014) گسترش جهانی داشته و شایع‌ترین کنه‌ی آلوده‌کننده‌ی سگ‌ها به شمار می‌رود (Dantas-Torres, 2010). در سابق تنها یک گونه به نام *Rh. sanguineus* شناخته شده بود. اما طی سال‌های اخیر و با پیشرفت ابزارها و تجزیه و تحلیل ژنتیکی رده‌ی گرمسیری کنه تحت عنوان *R. limmaei* نامگذاری شده است (Šlapeta et al., 2021; Šlapeta et al., 2022). رده‌ی معتدل کنه با نام *Rh. sanguineus* شناخته می‌شود (Dantas-Torres & Otranto, 2022; Nava et al., 2018). رده‌ی جنوب اروپا با نام *R. rutilus* معرفی شده است (Šlapeta et al., 2023). از آن‌جا که هر سه گونه در کشورهای مختلف جهان در نیم‌کره شمالی حضور داشته و کشور ایران دارای پهنه‌ی جغرافیایی وسیع با اقلیم‌های متفاوت می‌باشد. بررسی‌های ریخت‌شناسی و همه‌گیرشناسی مولکولی بر روی کنه‌های آلوده‌کننده سگ در ایران می‌تواند پرده از این حقیقت بردارد که در واقع کدام گونه‌های *Rh. sanguineus* در جمعیت‌های مختلف سگ‌ها در ایران حضور دارند.

در این تحقیق کنه‌های *H. asiaticum* و *H. excavatum* از یک قلاده سگ در شهر همدان به دست آمد. در مطالعات گذشته میزان فراوانی آلودگی سگ‌های مشکین شهر در استان اردبیل به *Hyalomma marginatum*، *H. asiaticum*، *Hyalomma anatolicum* به ترتیب ۱۰/۹۵٪، ۱۳/۶۹٪، ۴/۱٪ (Khazeni et al., 2013) و میزان شیوع آلودگی *H. marginatum* در گیلانغرب کرمانشاه ۲/۱۵٪ گزارش شده است (Mirani et al., 2017). به علاوه میزان فراوانی آلودگی

با گونه‌ی *Haemaphysalis flava* در ایلام ۱/۶٪ بوده (Bahrami et al., 2012) و در مشکین شهر *Dermacentor marginatus* و *Dermacentor niveus* فراوانی ۰۵/۲٪ و ۲۷/۱۰٪ گزارش شده‌اند (Khazeni et al., 2013). همچنین در یک مطالعه بر روی ۱۴۳ قلاده سگ در تهران میزان فراوانی *Rhipicephalus bursa* (۳۰/۱٪) بیش از *Rh. sanguineus* گزارش شد (Jamshidi et al., 2012). از آن‌جا که میزان فراوانی آلودگی به کنه و نیز فون کنه‌های سگ در بسیاری از نقاط کشور تاکنون نامشخص است برنامه‌ریزی جهت مطالعات گسترده‌ی اپیدمیولوژیک در یک بازه‌ی زمانی معین ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی نقش کنه‌های *Rhipicephalus turanicus* و *Rhipicephalus sanguineus* در اپیدمیولوژی انگل‌های *Cercopithifilaria bainaе* و *Hepatozoon canis* در ایران است. جهت محافظت سگ‌ها از کنه‌زدگی و متعاقباً بروز بیماری‌های کنه‌زاد از جمله سرکوپیتی‌فیلاریوزیس و هپاتوزونوزیس استفاده از داروها و سموم مؤثر و نیز قلاده‌های ضدانگل خارجی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزارى

بدین وسیله نویسندگان از همکاری آقایان و خانم‌ها فرزاد نعمتی، لیلی مرادی، دکتر علی صادقی نسب، فاطمه نیک‌بین، احسان یلفانیان، سامان فرجی، حسین خوشروزی و دکتر علی گودرز تله‌جردی تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

حمایت مادی و معنوی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی نویسنده‌ی اول بوده و تحت حمایت‌های مالی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان انجام گرفته است.

REFERENCES

- Amoli, A., Rahmani, A., Khoshnegah, J. & Razmi, Gh. R. (2012) A preliminary parasitological survey of *Hepatozoon* spp. infection in dogs in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 7(4), 99-103.
- Angelou, A., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Symeonidou, I., Theodoridis, A., Polizopoulou, Z. S., Otranto, D. & Papadopoulos, E. (2020) *Cercopithifilaria* species in dogs and ticks from Greece. *Parasitology Research* 119(10), 3391-3400. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06784-3>
- Bahrami, A. M., Doosti, A. & Ahmady Asbchin, S. (2012) Cat and dogs ectoparasite infestations in Iran and Iraq boarder line area. *World Applied Sciences Journal* 18(7), 884-889. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.07.1376>
- Baneth, G., Samish, M., Aleksefv, E., Aroch, I. & Shkap, V. (2001) Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology* 87(3), 606-611. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0606:TOHCTD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0.CO;2)
- Baneth, G., Samish, M. & Shkap, V. (2007) Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology* 93(2), 283-299. <https://doi.org/10.1645/GE-494R.1>
- Bezerra-Santos, M. A., de Macedo, L. O., Nguyen, V. L., Manoj, R. R. S., Laidoudi, Y., Latrofa, M. S., Beugnet, F. & Otranto, D. (2022) *Cercopithifilaria* spp. in ticks of companion animals from Asia: new putative hosts and vectors. *Ticks and Tick-borne Diseases* 13(4), 101957. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101957>
- Brianti, E., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Gaglio, G., Napoli, E., Brucato, G., Cauquil, L. & Giannetto, S. (2012) *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. *Veterinary Parasitology* 183(3-4), 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.031>
- Casiraghi, M., Anderson, T. J. C., Bandi, C., Bazzocchi, C. & Genchi, C. (2001) A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 122(1), 93-103. <https://doi.org/10.1017/s0031182000007149>
- Dantas-Torres, F. (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152(3-4), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.011>
- Dantas-Torres, F. (2010) Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites and Vectors* 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>

- Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Weigl, S., Tarallo, V. D., Lia, R. P. & Otranto, D. (2011) *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Journal of Parasitology* 93(2), 283-299. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2544-8>
- Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2022) *Rhipicephalus sanguineus* (Brown dog tick). *Trends in Parasitology* 38(11), 993-994. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.011>
- De Miranda, R. L., de Castro, J. R., Olegário, M. M. M., Beletti, M. E., Mundim, A. V., O'Dwyer, L. H., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M. C. & Baneth, G. (2011) Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Veterinary Parasitology* 177(3-4), 392-396. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.044>
- Ebrahimzade, E., Fattahi, R. & Ahoo, M. B. (2016) Ectoparasites of stray dogs in Mazandaran, Gilan and Qazvin Provinces, North and center of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* 10(3), 366-371.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D. & Petney, T. N. (2017) Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification (A. Estrada-Peña, Mihalca, A. D., Petney, T. N., Ed. 1st ed. ed.). *Springer*. [10.1007/978-3-319-63760-0](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63760-0)
- Gabrielli, S., Giannelli, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Bufalini, M., Fraulo, M., La-Torre Ramos, F. R. A. N., Cantacessi, C., Latrofa, M. S., Cancrini, G. & Otranto, D. (2014) Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. *Veterinary Parasitology* 205(1-2), 401-404. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.027>
- Giannelli, A., Lia, R. P., Annoscia, G., Buonavoglia, C., Lorusso, E., Dantas-Torres, F., Baneth, G. & Otranto, D. (2017) *Rhipicephalus turanicus*, a new vector of *Hepatozoon canis*. *Parasitology* 144(6), 730-737.
- Hodžić, A., Alić, A., Fuehrer, H. P., Harl, J., Wille-Piazza, W. & Duscher, G. G. (2015) A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites & Vectors* 8(1), 88-88. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0692-x>
- Hosseini-Chegeni, A., Tavakoli, M. & Telmadarraiy, Z. (2019) The updated list of ticks (Acari: Ixodidae & Argasidae) occurring in Iran with a key to the identification of species. *Systematic and Applied Acarology* 24(11), 2133-2166. <https://doi.org/10.11158/saa.24.11.8>
- Iatta, R., Sazmand, A., Nguyen, V. L., Nemati, F., Bahiraei, Z., Mazhar Ayaz, M., Giannico, A., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2021) Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. *Parasitology Research* 120(12), 4219-4228. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06992-x>
- Ionică, A. M., D'Amico, G., Mitková, B., Kalmár, Z., Annoscia, G., Otranto, D., Modri, D. & Mihalca, A. D. (2014) First report of *Cercopithifilaria* spp. in dogs from Eastern Europe with an overview of their geographic distribution in Europe. *Parasitology Research* 113(7), 2761-2764. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00436-014-3931-8>
- Jafari-Shoorijeh, S., Rowshan-Ghasrodashti, A., Tamadon, A., Moghaddar, N. & Behzadi, M. A. (2008) Seasonal frequency of ectoparasite infestation in dogs from Shiraz, Southern Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32(4), 309-313.
- Jamshidi, S., Maazi, N., Ranjbar-Bahadori, S., Rezaei, M., Morakabsaz, P. & Hosseininejad, M. (2012) A survey of ectoparasite infestation in dogs in Tehran, Iran. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21(3), 326. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000300030>
- Khazeni, A., Telmadarraiy, Z., Oshaghi, M. A., Mohebbali, M., Zarei, Z. & Abtahi, S. M. (2013) Molecular detection of *Ehrlichia canis* in ticks population collected on dogs in Meshkin-Shahr, Ardebil Province, Iran. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 6, 1-5. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2013.67A3001>
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lade, B., Patil, A. & Paikrao, H. (2014) Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. *SpringerPlus* 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-457>
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A. & Otranto, D. (2014) Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5(6), 943-946. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106582>
- Latrofa, M. S., Weigl, S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E. & Otranto, D. (2012) A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Tropica* 122(1), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.01.006>

- Maia, C., Casero, M., Annoscia, G., Latrofa, M. S., Colella, V., Pereira, A., Azevedo, F. & Otranto, D. (2017) *Cercopithifilaria* sp. II in *Vulpes vulpes*: new host affiliation for an enigmatic canine filarioid. *Parasitology Research* 116(1), 441-443. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5308-7>
- Manoj, R. R. S., Iatta, R., Latrofa, M. S., Capozzi, L., Raman, M., Colella, V. & Otranto, D. (2020) Canine vector-borne pathogens from dogs and ticks from Tamil Nadu, India. *Acta Tropica* 203, 105308. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105308>
- Minabaji, A., Moshaverinia, A. & Khoshnegah, J. (2020) Frequency of ectoparasite infestation in dogs in Mashhad, Northeast Iran. *Journal of Veterinary Research* 75(3), 280-287. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.274542.2894>
- Mirani, F., Yakhchali, M. & Naem, S. (2017) A study on ectoparasites fauna of dogs in suburbs of Ghilanegharb, Kermanshah province, Iran. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran* 72(1), 7-14 [Article in Persian with English abstract]. <https://doi.org/10.22059/jvr.2017.61285>
- Mosallanejad, B., Alborzi, A. R. & Katvandi, N. (2012) A Survey on ectoparasite infestations in companion dogs of Ahvaz District, South-west of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* 6(1), 70-78.
- Murata, T., Inoue, M., Taura, Y., Nakama, S., Abe, H. & Fujisaki, K. (1995) Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 57(1), 111-112. <https://doi.org/10.22092/ari.2017.110293.1125>
- Nava, S., Beati, L., Venzal, J. M., Labruna, M. B., Szabó, M. P., Petney, T., Saracho-Bottero, M. N., Tarragona, E. L., Dantas-Torres, F. & Silva, M. M. S. (2018) *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. *Ticks and Tick-borne Diseases* 9(6), 1573-1585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>
- O'Dwyer, L. H. (2011) Brazilian canine hepatozoonosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(3) 181-193. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000300002>
- Otranto, D., Brianti, E., Abramo, F., Gaglio, G., Napoli, E., Latrofa, M. S., Ramos, R. A., Dantas-Torres, F. & Bain, O. (2012) Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. *Veterinary Parasitology* 190(1-2), 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.016>
- Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Miro, G., Latrofa, M. S., Mutafchiev, Y. & Bain, O. (2013) Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitology* 140(1) 99-108. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001357>
- Otranto, D., Brianti, E., Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Annoscia, G., Weigl, S., Lia, R. P., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S. & Papadopoulos, E. (2012) On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasites & Vectors* 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-1>
- Otranto, D., Huchet, J. B., Giannelli, A., Callou, C. & Dantas-Torres, F. (2014) The enigma of the dog mummy from Ancient Egypt and the origin of '*Rhipicephalus sanguineus*'. *Parasites & Vectors* 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-2>
- Otranto, D., Varcasia, A., Solinas, C., Scala, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Martin, C., Mutafchiev, Y. & Bain, O. (2013) Redescription of *Cercopithifilaria bainae* Almeida & Vicente, 1984 (*Spirurida*, *Onchocercidae*) from a dog in Sardinia, Italy. *Parasites and Vectors* 6(1), 132. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-132>
- Petit, G., Bain, O., Cassone, J. & Seureau, C. (1988) La filaire *Cercopithifilaria roussilhonichez* la tique vectrice. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 63(4), 296-302. <https://doi.org/10.1051/parasite/1988634296>
- Ramos, R. A. N., Giannelli, A., Lia, R. P., Brianti, E., Tarallo, V. D., Breitshwerdt, E. B., Dantas-Torres, F., Stanneck, D. & Otranto, D. (2014) Incidence of *Cercopithifilaria bainae* in dogs and probability of co-infection with other tick-borne pathogens. *PLoS One* 9(2), e88198. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088198>
- Ramos, R. A. N., Giannelli, A., Brianti, E., Annoscia, G., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2013) Tick vectors of *Cercopithifilaria bainae* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. *Parasitology Research* 112(8), 3013-3017. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3474-4>
- Santos, M. A. B., de Macedo, L. O., Otranto, D., do Nascimento Ramos, C. A., do Rêgo, A. G. d. O., Giannelli, A., Alves, L. C., de Carvalho, G. A. & Ramos, R. A. N. (2018) Screening of *Cercopithifilaria bainae* and *Hepatozoon canis* in ticks collected from dogs of Northeastern Brazil. *Acta Parasitologica* 63(3), 605-608. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0069>

- Sazmand, A., Bahiraei, Z., Nemati, F., Annoscia, G., Bezerra-Santos, M. A., Nayebzadeh, H., Salemi, A. M., Mousavi, S. M., Sajjadi, S. M. & Otranto, D. (2022) Dermal microfilariae of dogs, jackals and cats in different regions of Iran. *Parasites & Vectors* 15, 28. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05141-2>
- Shamshiri, Z., Goudarztalejerdi, A., Zolhavarieh, S. M., Kamalpour, M. & Sazmand, A. (2022) Molecular Identification of *Bartonella* species in dogs and arthropod vectors in Hamedan and Kermanshah, Iran. *Iranian Veterinary Journal, In-Press*. <https://doi.org/10.22055/ivj.2022.325115.2436>
- Šlapeta, J., Chandra, S. & Halliday, B. (2021) The “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei*. *International Journal for Parasitology* 51(6), 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.001>
- Šlapeta, J., Halliday, B., Chandra, S., Alanazi, A. D. & Abdel-Shafy, S. (2022) *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks and Tick-borne Diseases* 102024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>
- Šlapeta, J., Halliday, B., Dunlop, J. A., Nachum-Biala, Y., Salant, H., Ghodrati, S., Modrý, D. & Harrus, S. (2023) The “southeastern Europe” lineage of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) identified as *Rhipicephalus rutilus* Koch, 1844: Comparison with holotype and generation of mitogenome reference from Israel. *Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases*, 3, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100118>
- 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. <https://doi.org/10.22092/ari.2017.110293.1125>
- Uni, S., Bain, O., Fujita, H., Matsubayashi, M., Fukuda, M. & Takaoka, H. (2013) Infective larvae of *Cercopithifilaria* spp. (Nematoda: *Onchocercidae*) from hard ticks (*Ixodidae*) recovered from the Japanese serow (*Bovidae*). *Parasite* 20(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2012001>
- Walker, J. B., Keirans, J. E. & Horak, I. G. (2000) *The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World Revised*, Cambridge University Press. <https://doi.org/doi.org/10.1017/CBO97805116661754>
- Zintl, A., Finnerty, E. J., Murphy, T. M., de Waal, T. & Gray, J. S. (2011) Babesias of red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland. *Veterinary Research* 42(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-7>

Identification of *Hepatozoon* and *Cercopithifilaria* in ticks infesting dogs from different regions of Iran

Zahra Bahiraei¹ , Alireza Sazmand¹ , Alireza Nourian¹  & Domenico Otranto^{1,2} 

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

✉ z.bahiraei@vm.basu.ac.ir

 <https://orcid.org/0000-0002-7023-1029>

✉ alireza_sazmand@yahoo.com

 <https://orcid.org/0000-0002-8450-2993>

✉ nourian@basu.ac.ir

 <https://orcid.org/0000-0002-3567-8677>

²Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Bari, Italy

✉ domenico.otranto@uniba.it

 <https://orcid.org/0000-0002-7518-476X>

Article History

Received: 12 January 2023 | Accepted: 21 April 2023 | Subject Editor: Alireza Saboori

Abstract

Following previous detection of *Hepatozoon canis* and *Cercopithifilaria baina* in dogs from Iran, this study aimed to identify potential tick vectors collected from dogs from five provinces of Iran. From October 2018 to September 2021, a total of 222 owned and 541 sheltered dogs from Hamedan ($n=305$), Kermanshah ($n = 227$), Yazd ($n =80$), Khouzestan ($n =71$), and Mazandaran ($n =80$) were examined for ticks. Collected ticks ($n =3339$) were identified morphologically, and adults were screened for the detection of *Hepatozoon* and *Cercopithifilaria* either with conventional PCR ($n=119$ ticks), tick dissection ($n=106$), or microscopical examination after fixation in formalin ($n =102$). A total of 169 dogs (22.1%) were infested with ticks. Tick infestation rate varied in different provinces (i.e., 32.4% in Hamedan, 27.3% in Kermanshah, 10.0% in Yazd), but no ticks were collected in dogs from Mazandaran and Khouzestan. The majority of male ticks were identified as *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (89.3%) and *Rhipicephalus turanicus*, but one dog from Hamedan was infested with *Hyalomma asiaticum* (1 male and 1 female) and *Hyalomma excavatum* (1 male). At the molecular examination, *Cercopithifilaria* was detected in 14.28%, *Hepatozoon* in 6.7% ticks, and both parasites in 1.68% of *Rhipicephalus* ticks. Parasites were not observed at tick dissection and histological examinations. Nucleotide sequencing and phylogenetic analyses revealed *C. baina* and *H. canis* in *R. sanguineus* sensu lato and *R. turanicus* ticks. Data suggests that both tick species above may play a role in the epidemiology of *Cercopithifilaria* and *Hepatozoon* in Iran.

Keywords: Tick, Filarial nematode, Protozal parasite, Iran, *Rhipicephalus*, Vector-borne pathogens

Corresponding Author: Alireza Sazmand (Email: alireza.sazmand@basu.ac.ir)

Citation: Bahiraei, Z., Sazmand, A., Nourian, A. & Otranto, D. (2023) Identification of *Hepatozoon* and *Cercopithifilaria* in ticks infesting dogs of different regions of Iran. *J. Entomol. Soc. Iran* 43 (1) 35–45. <https://doi.org/10.52547/jesi.43.1.6>