Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Detection and Epidemiological Aspects of Dirofilaria immitis in Dogs in Tabriz and Suburbs

Mahdi Hosseinzadeh Varjoy[1],
Javad Ashrafi Helan[2],
Nasrin Salehi[3],
Ahad Bazmani[4],
Ahmad Nematollahi[2],
Abbas Imani Baran[3]

[1] Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] MSc in Parasitology, Tabriz Research Center of Infectious and Tropical Diseases, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received August 17, 2015 Accepted December 28, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Dirofilaria immitis* is one of the most important pathogenic Nematoda for humans and carnivores, especially dogs. It causes a zoonotic disease, namely dirofilariasis in hosts with a wide variety of manifestations. The detection of infection is commonly carried out by different microscopic and serologic methods and recently by molecular techniques. This aim of this research was to provide an accurate assessment of the *D. immitis* infection rates in dogs in Tabriz and its suburbs using molecular technique and determination of the influence of epidemiological factors on infection rates.

Materials and methods: A descriptive study was performed in which a total of 121 dogs including sheepdogs, house dogs, guard dogs, commercial dogs and stray dogs (aged <2, 2-4 and 4< years old) were randomly selected from different areas in Tabriz, Iran. Blood samples were taken from the cephalic vein. To detect and assess the infection rates, after DNA extraction, a fragment of 432bp related to 18srRNA region was selected and amplified using specific primers.

Results: Fourteen blood samples (11.6%, mainly of sheepdogs) were found to be positive for *D. immitis*. The prevalence rates of infection showed significant differences between geographical areas (P= 0.36).

Conclusion: Despite great progress in prevention and control of parasitic diseases, dirofilariasis still occurs in canine community in East Azarbaijan province. Dog owners and veterinary services are recommended to pay ample attention to protect dogs against *D. immitis* infection and prevent subsequent transmission of infection to humans.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, dirofilariasis, molecular prevalence, dog, Tabriz

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(135): 20-31 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۵ فروردین سال ۱۳۹۵ (۳۱-۲۰)

تشخیص مولکولی و ارزیابی جنبه های اپیدمیولوژیکی *دایروفیلاریا ایمی تیس* در سگ های شهرستان تبریز و حومه

مهدی حسین زاده ورجوی[۱]
جواد اشرفی هلان[۲]
نسرین صالحی[۳]
احد بازمانی[۴]
احمد نعمت اللهی[۲]
عباس ایمانی باران[۳]

چکیده

سابقه و هدف: *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* یکی از مهم‌ترین نماتودهای بیماری‌زای مشترک بین انسان و گوشتخواران، به ویژه سگ، بوده و باعث بیماری زئونوز دایروفیلاریازیس در انسان و سگ می‌شود. تشخیص آلودگی عمدتاً از طریق روش‌های مختلف میکروسکوپی و سرولوژیکی و اخیراً به روش مولکولی انجام می‌شود. هدف از مطالعهٔ حاضر برآورد دقیق آلودگی انواع سگ‌ها در شهرستان تبریز و حومه به *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* با استفاده از روش مولکولی و تعیین فاکتورهای خطر اپیدمیولوژیکی مؤثر در شیوع آلودگی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، در مجموع ۱۲۱ قلاده سگ شامل سگ‌های گله، خانگی، نگهبان، تجاری و ولگرد با گروه‌های سنی زیر ۲ سال، ۴-۲ سال و بالای ۴ سال از مناطق مختلف شهرستان تبریز برای نمونه‌گیری انتخاب و از ورید سفالیک آن ها نمونهٔ خون اخذ گردید. پس از استخراج DNA، برای تشخیص و برآورد آلودگی قطعه‌ای به طول ۴۳۲ جفت باز از ژن 18s rRNA انتخاب و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد.

یافته‌ها: از ۱۲۱ نمونه خون اخذ شده، ۱۴ نمونه (۱۱/۶ درصد) (عمدتاً سگ گله) از نظر *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* مثبت بودند. در آنالیز آماری داده‌ها، صرفاً شیوع آلودگی بر اساس مناطق مختلف جغرافیائی ($p = ۰/۰۳۶$) دارای اختلاف معنی‌دار بود.

استنتاج: علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در کنترل و پیشگیری بیماری‌های انگلی، آلودگی به *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در جمعیت سگ‌های استان آذربایجان‌شرقی هم چنان وجود دارد و توصیه می‌شود یک توجه ویژه توسط صاحبان دام و مسئولین بهداشتی در ارتباط با حفاظت سگ‌ها در برابر آلودگی به این انگل مهم و احیاناً انتقال آن به جوامع انسانی مبذول شود.

واژه های کلیدی: *دایروفیلاریا ایمی‌تیس*، دایروفیلاریازیس، شیوع مولکولی، سگ، تبریز

مقدمه

دایروفیلاریا ایمی‌تیس از بیماری‌زاترین نماتودهای قلبی- ریوی سگ‌سانان و گربه‌سانان، به نام فیلری و عامل اصلی یکی از پیچیده‌ترین بیماری‌های دایروفیلاریازیس، می‌باشد. انگل تحت عنوان کرم قلب

مولف مسئول: عباس ایمانی باران – تبریز، جاده باسمنج، روبروی شهرک خاوران، دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز، گروه پاتوبیولوژی E-mail: a.imani@tabrizu.ac.ir
۱. دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. استاد، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴. کارشناسی ارشد انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۷/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۰/۹

www.SID.ir

Archive of SID

سگ در بطن راست و شریان‌های ریوی سگ‌سانان (میزبانان طبیعی) زندگی می‌کند و از طریق گزش بیش از ۷۰ گونه پشه منتقل می‌شود. آلودگی عمدتاً در سگ‌های بالای یک سال رخ می‌دهد(۳-۱). بیماری‌زائی، آسیب‌شناسی و تظاهرات بالینی دایروفیلاریازیس به لحاظ اهمیت فوق‌العادهٔ بیماری توسط محققان زیادی با تمام جزئیات در تمام نقاط دنیا بررسی شده‌اند(۵،۴). به طور مختصر، مهم‌ترین علائم بالینی دایروفیلاریازیس در سگ عبارت از سرفهٔ مداوم، تنگی نفس، عدم تحمل فعالیت‌های شدید بدنی، نارسائی احتقانی قلب، هموپتزی، همولیز داخل عروقی، ترومبوآمبولی ریوی، آسیت، بی‌اشتهائی و کاهش وزن هستند و چنان‌چه درمان نشوند، اغلب کشنده هستند(۶). بیماری کرم قلب سگ، یکی از زئونوزهای مطرح بین انسان و گوشتخواران در مناطق معتدل، گرمسیر و نیمه گرمسیر دنیاست(۷). انسان اگر چه میزبان تصادفی برای *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* محسوب می‌شود، ولی دایروفیلاریوزیس ریوی و نیز عفونت‌های اکتوپیک بارها از انسان گزارش شده‌اند. تا به حال بیش از ۱۷۰۰ مورد انسانی دایروفیلاریازیس (از جمله بیش از ۳۷۰ مورد ریوی) در سرتاسر دنیا به ثبت رسیده است و این نشان می‌دهد که هر کجا دایروفیلاریازیس سگ‌سانان وجود دارد، انسان‌ها نیز در معرض خطر آلودگی قرار دارند. بیش‌تر عفونت‌های انسانی، بدون نشانی هستند. انگل ضایعات سکه‌ای شکل را، که از اهمیت پاتولوژیکی پائینی برخوردار است، در ریه ایجاد می‌کند(۱۳،۲-۸). به طور کلی، ضایعات علی‌رغم خوش خیم بودن اهمیت بالایی برای انسان دارند، زیرا گرانولوماهای کروی زیر پرده جنب ممکن است از نظر رادیوگرافی با تومورهای اولیه یا متاستاتیک (نئوپلازی) ریوی اشتباه شوند که منجر به روش‌های غیر ضروری برای تشخیص (تراکئوتومی و بیوپسی) و درمان شوند(۱۴،۱). علاوه بر این، جراحات قلبی- عروقی، عفونت‌های داخل چشمی و پشت چشمی، عفونت‌های حفرهٔ صفاقی، چادرینه، اندام‌های جنسی نر و موارد نادری از منگوآنسفالیت از انسان گزارش شده‌اند(۱۵). در ایران *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* از سگ، روباه، شغال، گرگ و گربه گزارش شده است. تا به حال، آلودگی سگ‌ها از استان‌های آذربایجان شرقی(۱۹-۱۶)، آذربایجان‌غربی(۲۱-۲۰)، اردبیل(۲۲)، گیلان(۲۴-۲۳)، مازندران(۲۵-۲۳)، گلستان(۲۴-۲۳)، تهران(۲۶)، سمنان(۲۷)، خراسان رضوی(۲۸)، کرمانشاه (۲۹)، خوزستان(۳۲-۳۰)، فارس(۳۴-۳۳)، کرمان(۳۶-۳۵) و سیستان و بلوچستان(۳۶) با روش‌های تشخیصی متنوع و درصدهای مختلف شیوع گزارش شده است. موارد انسانی دایروفیلاریازیس ناشی از *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* از استان‌های هرمزگان(۳۷)، اردبیل(۳۸) و گلستان(۳۹) از اندام‌های مختلف افراد آلوده به ثبت رسیده‌اند. آلودگی با فیلرها در سگ‌سانان به دلیل آسیب بالقوهٔ این نماتودها، چالش‌های دخیل در تشخیص و بعضاً پتانسیل زئونوتیک بودن آن‌ها، دارای اهمیت بالائی است. به خاطر همین شاخصه‌های حائز اهمیت در دامپزشکی و بهداشت عمومی، انجام یک تشخیص دقیق از طریق روش‌های کارآمد و کاملاً مطلوب ضروری به نظر می‌رسد(۱۹). عموماً تشخیص وتعیین شیوع دایروفیلاریازیس بر پایهٔ شناسائی میکروسکوپیک میکروفیلرها در نمونه‌های خون حیوانات زنده و بازرسی پس از مرگ حیوانات مرده استوار است. اما به لحاظ حساسیت تشخیصی، هر کدام از روش‌های روتین مذکور کمابیش معایب خاص خود را داشته و بعضاً گمراه کننده هستند (از جمله آلودگی مخفی و درمان با ضد انگل‌های ماکرولیدی). هم‌چنین روش‌هایی مانند رادیوگرافی، کاردیوگرافی، هیستوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* کمک کننده هستند، ولی روش‌های تشخیصی مؤیّد و معتبر در بیماری کرم قلب تست‌های سرولوژیکی و مولکولی می‌باشند. چندین کیت تجاری الایزا برای تشخیص کرم قلب در سگ‌ها در دسترس هستند، ولی این کیت‌ها به دلایل متعددی قابلیت استفاده در مقیاس وسیع را ندارند. امروزه روش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

پلی‌مراز اختصاصی یک رهیافت مناسب برای غلبه بر معایب روش‌های قراردادی و سرولوژیک را نشان داده‌اند که در مقایسه با این روش‌های تشخیصی روتین، خیلی حساس، سریع، عملی و دقیق برای تشخیص فیلرهای خونی هستند(۴۲-۴۰). همان‌طوری که اشاره شد، اکثریت قریب به اتفاق گزارشات و مطالعات شیوع و پراکندگی دایروفیلاریازیس در ایران عمدتاً بر اساس روش‌های قراردادی میکروسکوپی و ندرتاً با استفاده از روش‌های سرولوژیکی بوده است. چون استان آذربایجان شرقی یکی از کانون‌های زئونوتیک دایروفیلاریازیس در ایران می‌باشد(۳۹)، هدف از مطالعهٔ حاضر برآورد مولکولی شیوع و انتشار جغرافیائی و تعیین شاخص‌های مؤثر در اپیدمیولوژی بیماری در انواع سگ‌های شهرستان تبریز و حومه می‌باشد و لازم به ذکر است که این مطالعه به لحاظ ماهیت مولکولی از معدود مطالعات در ارتباط با بررسی وضعیت آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در ایران می‌باشد.

مواد و روش ها

دام‌ها و نمونه‌ها

در این مطالعهٔ توصیفی، از خردادماه سال ۱۳۹۰ تا تیرماه سال۱۳۹۱، در مجموع به طور تصادفی ۱۲۱ قلاده سگ از شهرستان تبریز و روستاهای اطراف، با رعایت تمام اصول و شاخص‌های مد نظر در مطالعه، برای نمونه‌گیری انتخاب و نمونه‌های خون از آن ها اخذ گردید. به طور کلی، مشخصات سگ‌ها عبارت بودند از: سگ خانگی (۲۵ قلاده)، سگ گله (۷۹ قلاده)، سگ نگهبان (۶ قلاده)، تجاری (۷ قلاده) و سگ ولگرد (۴ قلاده)، تعداد نر و ماده به ترتیب ۱۰۴ و ۱۷ قلاده، گروه‌بندی سنی بر اساس فرمول دندانی(۱۴) به صورت: زیر ۲ سال، ۴-۲ سال و بالای ۴ سال.

در طول نمونه‌برداری بعد از ثبت مشخصات سگ‌ها، هر دام از نظر جسمی معاینه شد و برای انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از هر قلاده سگ، ۲ سی‌سی خون از ورید سفالیک دست با استفاده از سرنگ استریل اخذ و به لوله‌های حاوی EDTA وارد شد. نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرد و در ۴°C به مرکز بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز واقع در بیمارستان سینا انتقال داده شدند و تا زمان استفاده در ۲۰°C- ذخیره شدند.

آزمایش میکروسکوپی نمونه‌های خون برای مشاهدهٔ میکروفیلر *دایروفیلاریا ایمی‌تیس*

بعد از اتمام مرحلهٔ نمونه‌برداری، نخست آزمایش میکروسکوپی بر روی نمونه‌های خون برای مشاهدهٔ میکروفیلرهای *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* صورت گرفت. بدین منظور با استفاده از روش تکمیل شدهٔ نات یک سانتی‌متر مکعب خون با ۹ سانتی‌متر مکعب فرمالین ۲ درصد مخلوط گردید و به آرامی تکان داده شد تا عمل همولیز انجام شود. در آزمایشگاه نمونه‌های خون به مدت ۳ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفوژ شد و پس از تخلیهٔ مایع رویی به رسوب حاصل یک قطره بلودومتیلن یک در هزار اضافه گردید و رسوب به تدریج با انتقال به روی لام و گذاردن لامل از نظر وجود میکروفیلر آزمایش شد(۱۷).

استخراج DNA و آزمایش PCR برای تشخیص دایروفیلاریا ایمی‌تیس

در این مرحله، استخراج DNA *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* از ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های خون کامل EDTA دار با استفاده از کیت پاکژن یاخته (DNA Extraction Kit, Pakgene Yakhteh, Iran) طبق دستور شرکت سازنده کیت انجام گرفت. ابتدا پرایمرهایی با مشخّصات زیر:

Dir im16 F: GCATCTT AGAACTT GGTCC ATCC

Dir im16 R: CAAGGCGTATTTACCGCCGAC

برای تکثیر قطعه‌ای تقریباً به طول۴۳۲ جفت باز از توالی ژنی (18S rRNA (Partial ssu18S rRNA، طراحی و برای ساخت آن‌ها توسط شرکت زیست

www.SID.ir

Archive of SID

فناوری کوثر سفارش داده شد. هم‌چنین برای حصول اطمینان از این که تمام نمونه‌ها دارای DNA سگ می‌باشند، یک جفت پرایمر داخلی نیز به ترتیب زیر:

DOG F: TGCAAGTGCCAAGTTTACAGA

DOG R: ACTTCGGTGTATTGCGGAGGCGTAGGTG

طراحی و بعد از ساخت آن ها توسط شرکت زیست فناوری کوثر، مورد استفاده قرار گرفتند.

به طور خلاصه، هر مخلوط واکنش (۲۵ میکرولیتر) حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۳ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰ پیکومول از هرکدام از پرایمرها، ۲۵۰ میلی مول dNTPs، ۵ واحد آنزیم *Taq*DNA پلی‌مراز و ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده بود. تکثیر PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر قابل برنامه‌ریزی مدل Astec (PC701 Thermal Cycler; Astec, Fukuoka, Japan) با برنامه زمان‌بندی زیر انجام شد: یک واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، که بعداً با ۴۰ چرخه به ترتیب واسرشت در ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، اتّصال در ۶۳°C به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه دنبال شد. یک مرحلهٔ تکثیر نهائی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه نیز انجام شد.

مقادیری از هر محصول تکثیر شده (۸ میکرولیتر) در ژل آگارز ۱/۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) جهت تعیین مثبت یا منفی بودن از نظر *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* با استفاده از الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه آنالیز و نتیجهٔ آن‌ها در ژل داک رویت شد. لازم به ذکر است که کنترل مثبت *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* از نمونه‌های موجود در آرشیو انگل‌شناسی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز که از مطالعهٔ قبلی(۱۷) در استان آذربایجان‌شرقی به دست آمده بودند، تهیه گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

در این تحقیق سگ‌ها براساس کاربری، سن، جنس، نژاد و منطقهٔ جغرافیائی برای تعیین ارتباط این شاخص‌ها با شیوع آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* گروه‌بندی شدند و تست مربع کای (χ^2) برای معنی‌دار بودن یا نبودن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل‌های داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (Version 14,SPSS Inc.,Chicago,IL,USA) با حدود اطمینان ۹۵ درصد و ارزش احتمالی $p<0/05$ به عنوان معنی‌دار بودن از نظر آماری انجام شدند.

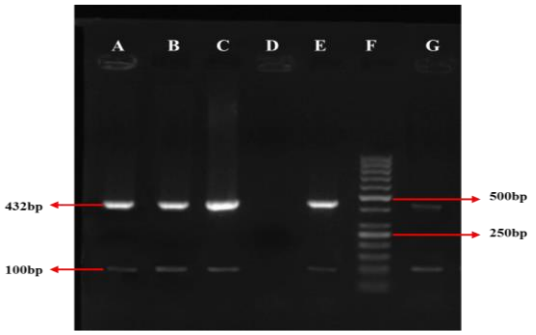
یافته ها

در بررسی میکروسکوپیک مبتنی بر روش تکمیل شدهٔ نات (Knott) بر روی ۱۲۱ نمونهٔ خون، مواردی از آلودگی با میکروفیلر *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* یا میکروفیلرهای مشابه مشاهده نشد. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در مجموع ۱۴ نمونه (۱۱/۶ درصد) از ۱۲۱ نمونه خون با نشان دادن باند تکثیر شدهٔ ۴۳۲bp بر روی ژل آگارز متعاقب الکتروفورز محصولات PCR (تصویر شماره ۱)، از نظر آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* مثبت بودند. از نظر پراکندگی جغرافیائی، بالاترین درصد آلودگی متعلق به روستاهای واقع در شمال‌غربی (۳۳/۳ درصد) و پائین‌ترین آن مربوط به شهر تبریز و روستاهای واقع در جنوب‌شرقی (صفر) شهرستان تبریز بود (جدول شماره ۱). در بین انواع سگ‌ها از نظر کاربری، سگ‌های گله بالاترین (۱۶/۵ درصد) و سگ‌های خانگی، نگهبان و ولگرد پائین‌ترین (صفر) درصد آلودگی را از خود نشان دادند (جدول شماره ۱). به لحاظ جنسیت سگ‌های ماده بیش‌ترین (۱۱/۸ درصد) آلودگی را نسبت به سگ‌های نر(۱۱/۵ درصد) نشان دادند (جدول شماره ۲). در بین روستاهای نمونه‌برداری شده، آلودگی فقط در چهار روستا مشاهده شد و در بقیهٔ روستاها موردی از آلودگی مشاهده نگردید (جدول شماره ۲). در این مطالعه، برای ارزیابی تأثیر شاخص نژاد در میزان آلودگی، سگ‌های مورد مطالعه عمدتاً متعلق به دو نژاد بومی و مخلوط بودند که نژاد بومی دارای بیش‌ترین درصد آلودگی (۱۵/۷ درصد) نسبت به مخلوط (۲/۶ درصد) بودند (جدول شماره ۳). از نظر شاخص سنی، بیش‌ترین درصد آلودگی (۱۷/۱ درصد) با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس*

www.SID.ir

Archive of SID

متعلق به گروه سنی بالای ۴ سال و کم‌ترین درصد آلودگی (۷/۹ درصد) نیز به سگ‌های زیر ۲ سال تعلق داشتند (جدول شماره ۳). بر اساس نتایج به دست آمده و آنالیزهای آماری داده‌ها با تست مربع کای (χ^2)، میانگین پراکندگی آلودگی به *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* بر اساس مناطق مختلف شهرستان (p =۰/۰۳۶). دارای اختلاف معنی‌دار بود، ولی بر اساس نژاد سگ‌ها (p =۰/۰۶۱)، جنسیت سگ‌ها (p =۰/۲۵)، کاربری سگ‌ها (p =۰/۱۶۷) و گروه سنی سگ‌ها (p =۰/۴۷۴) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات PCR مربوط به *دایروفیلاریا ایمی تیس* (F: Ladder، E: کنترل مثبت و کنترل داخلی، D:کنترل منفی، A,B,C&G: باند ۴۳۲bp مربوط به *دایروفیلاریا* و باند ۱۰۰bp مربوط به کنترل داخلی)

جدول شماره ۱: میزان آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* براساس پراکندگی و کاربری سگ‌ها در مناطق مختلف شهرستان تبریز

براساس پراکندگی در مناطق مختلف				براساس کاربری			
مناطق	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)	کاربری	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)
شرق	۲۱	(۴/۸)۱	(۹۲/۲)۱۸	گله	۷۹	(۱۶/۵)۱۳	(۸۳/۵)۶۶
شمال غربی	۱۲	(۳۳/۳)۴	(۶۶/۷)۸	خانگی	۲۵	۰	(۱۰۰)۲۵
جنوب شرقی	۲۱	۰	(۱۰۰)۲۱	تجاری	۷	(۱۴/۳)۱	(۸۵/۷)۶
جنوب غربی	۳۸	(۲۳/۷)۹	(۷۶/۳)۲۹	نگهبان	۶	۰	(۱۰۰)۶
شهر	۲۹	۰	(۱۰۰)۲۹	ولگرد	۴	۰	(۱۰۰)۴
کل نمونه	۱۲۱	(۱۱/۶)۱۴	(۸۸/۴)۱۰۷	کل نمونه	۱۲۱	(۱۱/۶)۱۴	(۸۸/۴)۱۰۷

جدول شماره ۲: میزان آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی تیس* براساس جنسیت در کاربری و پراکندگی جغرافیائی (به تفکیک روستا)

براساس جنسیت در کاربری					براساس پراکندگی جغرافیائی (به تفکیک روستا)			
کاربری	جنس	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)	نام روستا	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)
گله	ماده	۲	(۱۰۰)۲	۰	بارانلو	۱	۰	(۱۰۰)۱
	نر	۷۷	(۱۴/۳)۱۱	(۸۵/۷)۶۶	باسمنج	۹	۰	(۱۰۰)۹
خانگی	ماده	۹	۰	(۱۰۰)۹	کلینیک ارک	۱۲	۰	(۱۰۰)۱۲
	نر	۱۶	۰	(۱۰۰)۱۶	کلینیک دانشگاه	۶	۰	(۱۰۰)۶
نگهبان	ماده	۲	۰	(۱۰۰)۲	کلینیک سینا	۱۱	۰	(۱۰۰)۱۱
	نر	۴	۰	(۱۰۰)۴	اصفهلان	۳۲	(۲۵)۸	(۷۵)۲۴
تجاری	ماده	۱	۰	۰	گوار	۳	۰	(۱۰۰)۳
	نر	۶	(۱۶/۷)۱	(۸۳/۳)۵	کردلر	۳	۰	(۱۰۰)۳
ولگرد	ماده	۳	۰	(۱۰۰)۳	لاهیجان	۲	(۵۰)۱	(۵۰)۱
	نر	۱	۰	(۱۰۰)۱	لیقوان	۴	۰	(۱۰۰)۴
کل نمونه	ماده	۱۷	(۱۱/۸)۲	(۸۸/۲)۱۵	ملک‌کیان	۱۸	(۵/۶)۱	(۹۴/۴)۱۷
	نر	۱۰۴	(۱۱/۵)۱۲	(۸۸/۵)۹۲	سهلان	۱۲	(۳۳/۳)۴	(۶۶/۷)۸
					اسیراخان	۸	۰	(۱۰۰)۸
					کل نمونه	۱۲۱	(۱۱/۶)۱۴	(۸۸/۴)۱۰۷

جدول شماره ۳: میزان آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی تیس* بر اساس سن و نژاد

بر اساس سن*			بر اساس نژاد			
سن	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)	نوع نژاد	تعداد نمونه	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی(درصد)
زیر ۲ سال	۳۸	(۷/۹)۳	(۹۲/۱)۳۵	بومی	۸۳	(۱۵/۷)۱۳	(۸۴/۳)۷۰
۴-۲ سال	۳۰	(۱۳/۳)۴	(۸۶/۷)۲۶	مخلوط	۳۸	(۲/۶)۱	(۹۷/۴)۳۷
بالای۴ سال	۴۱	(۱۷/۱)۷	(۸۲/۹)۳۴	کل نمونه	۱۲۱	(۱۱/۶)۱۴	(۸۸/۴)۱۰۷
کل نمونه	۱۰۹	(۱۲/۸)۱۴	(۸۷/۲)۹۵				

* سن ۱۲ قلاده قابل تخمین نبود.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مطابق با شواهد موجود، استان آذربایجان‌شرقی یکی از کانون‌های زئونوز برای دایروفیلاریازیس ناشی از *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* می‌باشد(۳۹). بررسی‌های متعدد در این استان درصدهای ۸/۴، ۱۴/۷، ۲۶/۳، ۳۰ و ۳۱/۶ را برای سگ‌های مورد مطالعه نشان داده‌اند و این تعدد مطالعات قطعاً حاکی از اهمیت این بیماری در استان آذربایجان‌شرقی می‌باشد(۱۹-۱۶،۴۳). علی‌رغم جهانی بودن بیماری دایروفیلاریازیس سگ‌سانان و افزایش قابل ملاحظه دامنه جغرافیایی آن در ده سال گذشته در مناطق مختلف دنیا(۴۴)، که مستلزم توجه اساسی برای تشخیص دقیق و روشن نمودن جنبه‌های اپیدمیولوژیکی واقعی آن می‌باشد، ولی با نگاه کلی به مطالعات صورت گرفته در خصوص این بیماری در جهان معلوم می‌شود که بررسی‌ها عمدتاً بر اساس روش‌های روتین سرولوژیک و مشاهدهٔ میکروسکوپیک میکروفیلر در خون بوده‌اند و از روش‌های دقیق و اختصاصی مولکولی در بررسی‌های شیوع دایروفیلاریوزس کم‌تر استفاده شده است. این واقعیت در ایران نیز وجود دارد، به طوری که در هیچ نقطه‌ای از ایران به جز یک مورد در استان آذربایجان‌شرقی(۱۹)، مطالعه‌ای جامع مبتنی بر روش مولکولی به چشم نمی‌خورد.

در مطالعهٔ حاضر که بر اساس یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های تشخیصی موجود به انجام رسید، میزان آلودگی به *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در بین جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۱/۶ درصد برآورد شد. در بررسی میکروسکوپی و مولکولی برای برآورد شیوع *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در بین ۸۸۶ سگ در چین، ۲۴ درصد سگ‌ها آلودگی را در نتایج مولکولی نشان داده‌اند که در مقایسه با نتایج میکروسکوپی (۱۶/۶ درصد) تفاوت معنی‌دار بین نتایج دو روش در این مطالعه گزارش شده است(۴۵). در برزیل بررسی شیوع دایروفیلاریازیس در بین ۱۸۸ سگ با استفاده از روش تکمیل شده نات، ۳۴/۴۵ درصد سگ‌ها آلوده نشان داده شدند. اگر چه اساس بررسی شیوع به روش مولکولی نبود، ولی بررسی مجدد مولکولی نمونه‌های مثبت و تعیین توالی آن‌ها نشان داده است که تمامی نمونه‌های آلوده صرفاً *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* بودند(۴۶). در مطالعه‌ای مشابه در استان آذربایجان‌شرقی(۱۹)، اگرچه میزان شیوع *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* ۲۶/۳ درصد گزارش شد، ولی به نوع، جنس و سن سگ‌های مورد مطالعه اشاره نشده است. یکی از اساسی‌ترین شاخصی که در مطالعهٔ حاضر برای برآورد میزان آلودگی *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در نظر گرفته شد، انواع کاربری سگ‌ها بود که همین معیار مهم احتمالاً دلیلی برای تفاوت در میزان شیوع دایروفیلاریازیس در دو مطالعهٔ مشابه در یک حوزه می‌باشد، به طوری که در مطالعهٔ فعلی، بیش‌ترین جمعیت سگ‌ها از نظر کاربری مربوط به سگ‌های گله بود (۶۵/۳ درصد) و ضمناً بالاترین میزان آلودگی نیز در بین همین سگ‌ها مشاهده گردید (۹۲/۷ درصد). شیوع فیلاریوزیس در سگ‌ها در نواحی مختلف بر حسب شرایط محیطی، آب وهوائی، تراکم جمعیتی ناقل، وضعیت زیستی حیوان، میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه، روش تشخیص، وضعیت آلودگی (آشکار یا مخفی)، جابجائی دام‌ها، تجارت بین‌المللی و برنامه‌های نظارتی و کنترلی متغیر است(۳۲،۲۳). در بررسی سرولوژیکی و مولکولی *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در سگ‌های ولگرد و صاحب‌دار برخی مناطق ترکیه، علی‌رغم مثبت بودن ۱۲/۸ درصد سگ‌ها در بررسی شیوع سرمی دایروفیلاریازیس، ولی هیچ‌کدام از سگ‌ها از نظر مولکولی آلودگی *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* را از خود نشان ندادند و بیش‌ترین شیوع سرمی دایروفیلاریازیس مربوط به سگ‌های ولگرد بود(۴۲)، در صورتی‌که در مطالعهٔ مشابه سرولوژیکی و مولکولی دایروفیلاریازیس در مجارستان، ۴/۲۵ درصد سگ‌های آلوده به طور مشترک در نتایج سرولوژیکی و مولکولی آلودگی با گونهٔ *دایروفیلاریا رپنس* را نشان دادند(۴۷). از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در شیوع دایروفیلاریازیس جمعیت مطلوب پشه‌های ناقل است(۴۲).

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی دایروفیلاریازیس در کره نشان داده شد که شیوع بیماری در مناطق ساحلی به مراتب بیش‌تر از مناطق کوهستانی و شهری می‌باشد(۴۸). همین‌طور، رنجبر بهادری و همکاران(۲۳) نشان دادند که نواحی ساحلی شمال ایران به دلیل شرایط آب و هوائی مساعد برای حضور گونه‌های متعدد پشه‌های ناقل و وفور سگ‌های ولگرد و گوشت‌خواران وحشی، بیش‌ترین شیوع دایروفیلاریازیس را نسبت به نواحی دیگر دارد.

در مطالعهٔ مشابه قبلی که فقط در مناطق شمالی استان آذربایجان‌شرقی انجام شده است، شیوع آلودگی با *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* ۵۷/۴ درصد نشان داده شد(۱۹) و در مطالعهٔ حاضر نیز شیوع دایروفیلاریازیس در روستاهای واقع در شمال غربی تبریز نسبت به مناطق دیگر بالاتر بود. با توجه به نتایج دو مطالعه، شیوع بالای بیماری در این مناطق می‌تواند به این دلیل باشد که این مناطق به سبب دارا بودن منابع غنی و متنوع آبی و گیاهی، مناسب‌ترین مکان برای حضور انواع پشه‌هاست، در صورتی که مناطق مرکزی و جنوبی استان آذربایجان‌شرقی به لحاظ منابع آبی و گیاهی در حد متوسط بوده و عمدتاً مناطق کوهستانی هستند و دارای مراتع فراوان برای پرورش گوسفند می‌باشند و با توجه به ویژگی‌های محیطی به نظر می‌رسد این مناطق جغرافیائی محیط چندان مناسبی برای زیست پشه‌های ناقل نیست. لازم به ذکر است که در عمده مطالعات مشابه اظهار شده است که آیا تغییرات محسوس در جهت کاهش، به علت اختلافات نمونه‌برداری تصادفی، اختلافات در شیوهٔ بررسی و یا کاهش واقعی در شیوع می‌باشد یا خیر کاملاً نامعلوم است(۴۲).

بر اساس نتایج حاصله، آلودگی *دایروفیلاریا ایمی‌تیس* در مناطق مختلف شهرستان تبریز متفاوت بود ($p = ۰/۰۳۶$). این یافته موافق با نتایج مطالعهٔ مشگی و همکاران(۱۷) و مغایر با نتایج مطالعات دیگر در برخی مناطق ایران(۳۱،۲۷) می‌باشد. اگر چه بیش‌ترین شیوع مربوط به گروه سنی بالای ۴ سال بود، ولی بین شیوع آلودگی و سن، ارتباط معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نگردید و این یافته با نتایج مطالعات دیگران (۵۰،۴۹،۳۱،۲۷،۲۳،۱۹،۱۸) کاملاً هم‌خوانی داشت، در صورتی‌که در برخی مطالعات (۵۱-۵۴،۴۸،۳۲،۲۴،۲۲،۱۷،۷) ارتباط معنی‌دار گزارش شده‌اند. افزایش تدریجی شیوع آلودگی توأم با افزایش سن سگ‌ها ناشی از گزش بیش‌تر توسط پشه‌ها، شرایط آلوده‌کننده طی سال‌های بیش‌تر زندگی، حضور طولانی مدت میکروفیلر در خون، عدم ایمنی‌زائی کافی در برابر انگل بالغ بیان شده است(۲۹،۲۸).

در این مطالعه شیوع آلودگی بین جنس‌های نر (۱۱/۵ درصد) و ماده (۱۱/۸ درصد) تقریباً برابر بود و چنین مشابهتی در بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته در ایران و سایر کشورها (۵۵-۵۷،۵۳،۵۰،۴۹،۴۲،۳۵،۳۲،۳۱،۲۷،۲۲-۲۴،۱۸،۷) مشاهده می‌شود. با اندک تفاوتی که در مواردی شیوع آلودگی در بین سگ‌های نر مختصراً بیش‌تر گزارش شده است. بر عکس، در برخی مطالعات(۵۹،۵۸،۵۴) تفاوت آماری در شیوع آلودگی بین جنس‌ها با درصد بالا در بین سگ‌های نر توصیف شده است و دلیل آن را عمدتاً به تأثیر هورمون‌های جنسی بر آلودگی و تمایل بیش‌تر صاحبان برای نگهداری سگ‌های نر در بیرون از منازل برای حفاظت از امنیت و اموال نسبت می‌دهند(۶۰،۴۸). از لحاظ کاربردی، در بین انواع سگ‌ها در مطالعه حاضر برای شیوع آلودگی اختلاف آماری یافت نشد. با این وجود، بیش‌ترین میزان آلودگی اختصاص به سگ‌های گله داشت. بیش‌تر مطالعات دخالت عامل کاربری (نوع) را در معنی‌دار بودن شیوع آلودگی بی‌تأثیر دانسته‌اند، با این حال گزارش کرده‌اند که سگ‌های ولگرد نسبت به سایر جمعیت سگ‌های مورد مطالعه، بیش‌ترین شیوع را از خود نشان دادند(۳۶،۱۸). به نظر می‌رسد از دلایل اصلی بالا بودن شیوع آلودگی در بین سگ‌های گله (۱۶/۵ درصد) در مطالعهٔ حاضر حجم بالای جمعیت سگ‌های گله می‌باشد. در شیوع آلودگی بین سگ‌های بومی و نژاد مختلط، تفاوت معنی‌داری در بین نژادهای

www.SID.ir

Archive of SID

موجـود در مطالعـهٔ حاضـر وجـود نداشـت و در برخـی مطالعات نیز بی‌تأثیر بـودن ایـن شـاخص مشـخص شـده اسـت(۵۰،۴۹،۳۲). امـروزه همگـام بـا پیشـرفت‌هـای روز افزون بشر در تمامی زمینه‌ها، به ویژه بهداشـت عمـومی، به سبب ارائهٔ راه‌کارهای کنترلی و پیشگیرانه دقیق، عملاً مشاهده می‌شود که طیف وسیعی از بیماری‌های مشترک و غیر مشترک ریشه‌کن شده‌اند و از آن هـا صـرفاً نـامی در متون علمی بر جای مانده است، ولی همان‌گونـه کـه نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد، ایـن بیمـاری مشـترک انگلی هم‌چنان در این نقطه از ایران وجود دارد و به جـز چند مطالعهٔ محدود هیچ اقدامی در ارتباط با این بیماری صورت نگرفتـه اسـت و در نتیجـه دایروفیلاریـازیس بـه صـورت یـک بیمـاری پنهـان در بـین سـگ‌هـای اسـتان آذربایجان‌شرقی حضور دارد. توصیه مـی‌شـود صـاحبان دام و مسئولین امور بهداشتی، توجه اساسی در ارتباط بـا ایـن بیمـاری در جهـت کنتـرل و پیشـگیری هـم در بعـد انسانی و هم در بعد حیوانی مد نظر قرار دهند.

سپاسگزاری

از معاونت محتـرم پژوهشـی و تحصـیلات تکمیلـی دانشـکدهٔ دامپزشـکی تبریـز و نیـز از معاونـت پژوهشـی دانشگاه تبریز به خاطر مساعدت در تأمین اعتبـار مـالی و امکانات مـورد نیـاز در بـه ثمـر رسـیدن ایـن پـروژه کـه قسمتی از پایان نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی به شمارهٔ ۴۳/۳۴۱۷د می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Maxie MG. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. US: Saunders Ltd; 2007.
2. Shaw SE, Day MJ. Arthropod-borne Infectious Diseases of Dog and Cat. Manson Press; 2005.
3. Dillion R. Dirofilariasis in Dogs and Cats. In: Ettinger S, Feldman EC (Eds). Text book of Small Animal Internal Medicine. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
4. Knight DH. Heartworm Heart Disease. Adv Vet Sci Comp Med 1977; 21: 107-149.
5. Waren WA. Heartworm disease in small Animal Internal Medicine. 3rd ed. Nelson RW, Couto CG, (ed). US: Mosby; 2003.
6. Morchon R, Simon F, Gonzalez-Miguel J, Mellado I. Relationship *Dirofilaria*/Host: Cellular and molecular mechanisms of the heartworm disease vascular pathology, in *proceeding of Second European Dirofilaria Days, 16-18 September. Morchon R, Simon F, Montoya JA, Genchi C, (Eds). Salamanca, Spain*. 2009.
7. Vieira AL, Vieira MJ, Oliveira JM, Simoes AR, Diez-Banos P, Gestal J. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. Parasite 2014; 21(5): 1-7.
8. Tylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary Parasitology. 3thed. New jersey: Blackwell; 2001.
9. Robinson NB, Chavez CM, Conn JH. Pulmonary Dirofilariasis in Man. A case report and review of the literature. J Thoracic Cardiovascul Surg 1977; 74(3): 403-408.
10. Echeverri A, Long RF, Check W, Burnett CM. Pulmonary dirofilariasis. Ann Thoracic Surg 1999; 67(1): 201-202.
11. Montoya-Alonso JA, Mellado I, Carretón E, Cabrera-Pedrero ED, Morchón R, Simón F. Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitol Res 2010; 107(5): 1265-1269.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, et al. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. Clin Microbiol Rev 2012; 25(3): 507-544.
13. Ciferri F. Human pulmonary dirofilariasis in the United States: a critical Review. Am J Trop Med Hyg 1982; 31(2): 302-308.
14. Etinger S, Feldman CE. Text book of Small Animal internal medicine. WB Saunders Company 2000, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000.
15. Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasit Vectors 2014; 7: 30.
16. Zarif-Fard M. Survey of Canine Helminth Parasites in East Azerbaijan with emphasis on *Echinococcus multilocularis* and their importance in public health. (Thesis PhD) Parasitology Department, Faculty of Medicine, University of Tehran, 1994. (Persian).
17. Meshgi B, Eslami A, Ashrafi-Helan J. Epidemiological survey of blood filariae in rural and urban dogs of Tabriz. J Fac Vet Med Tehran Univ 2002; 57(4): 59-63 (Persian).
18. Nematollahi A, Javidi-Barazandeh MA. A Survey on Occurrence *Dirofilaria immitis* in Stray Dogs of Tabriz, Iran. Acta Vet Brno 2010; 79: 449-451 (Persian).
19. Razmaraii N, Sadegh-Eteghad S, Babaei H, Paykari H, Esmaeilnia K, Froghy L. Molecular Survey of Canine Microfilariae Species in East-Azerbaijan Province of Iran. Archiv Razi Inst 2013; 68(2): 125-129 (Persian).
20. Aryamanesh M. Study of Stray Dogs Infection to *Dirofilaria immitis* in Urmia City. 4th National Congress of the transition between human and animal diseases. Tehran; 2000 (Persian).
21. Javadi Sh, Hanifeh M, Tavassoli M, Dalir-Naghadeh B, Khezri A, Hadian M. Dirrofilariasis in Shepherd Dogs of High Altitudes Areas in West Azerbaijan-Iran. Vet Res Forum 2011; 2(1): 53-57 (Persian).
22. Bokai S, Moobedi A, Mohebali M, Hoseini H, Nadim A. Study on prevalence of dirofilariosis in Meshkinshahr-Northwest of Iran. J Fac Vet Med Univ Tehran 1998; 53(1-2): 23-26 (Persian).
23. Ranjbar-Bahadori SH, Veshgini A, Shirani D, Eslami A, Mohieddin H, Shemshadi B, Masoole R. Epidemiological Aspects of Canine Dirofilariasis in the North of Iran. Iranian J Parasitol 2011; 6(1): 73-80.
24. Malmasi A, Hosseini SH, Aramoon M, Bahonar A, Seifi HA. Survey of canine Dirofilaria immitis infection in Caspian provinces of Iran. Iranian J Vet Res 2011; 12(4): 344-348 (Persian).
25. Sadighian A. Helminth Parasites of stray Dogs and Jackals in Shahsavar area, Caspian Region, Iran. J Parasitol 1969; 55(2): 372-374.
26. Meshgi B, Eslami A. Study on filariosis of sheepdogs around of Tehran. J Fac Vet Med Tehran Univ 2001; 55(4): 53-57 (Persian).
27. Ranjbar-Bahadori Sh, Hekmatkhah A. A study on filariasis of stray dogs in Garmsar. J Vet Res 2007; 62(4): 73-76 (Persian).
28. Razmi Gh. Study on situation of infection to dogs of Mashhad to types of filaria. J Fac Vet Med Tehran Univ 1999; 54(1): 5-7 (Persian).
29. Bohloli Oskoii S, Sadeghi E, Hashemian AH, Ghaffari Khaligh S. Study on Shepherd Dog Dirofilariosis in Kermanshah province in 2011-2012. J Vet Lab Res 2013; 5: 47-54.

www.SID.ir

Archive of SID

30. Farahnak A, Mobedi I, Mohammadi F. Study of Zoonotic Helminthes of Carnivores in Khuzestan, Iran. Iranian J Publ Health 1998; 27(3,4): 15-20.
31. Ranjbar-Bahadori SH, Eidi-Delvarzadeh M, Shemshadi B. *Dirofilaria immitis* infection in stray dogs of Khuzestan, a province in South-Western Iran. Int J Vet Res 2009; 3(2): 133-136.
32. Razi-Jalali MH, Alborzi AR, Avizeh R, Mosallanejad B. A study on *Dirofilaria immitis* in healthy urban dogs from Ahvaz, Iran. Iranian J Vet Res 2010; 11(33): 357-362 (Persian).
33. Jafari S, Gaur, SNS, Khaksar ZA. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs of Fars province of Iran. J Appl Anim Res 1996; 9(1): 27-31 (Persian).
34. Sadjjadi SM, Mehrabani D, Oryan A. Dirofilariosis of Stray Dogs in Shiraz, Iran. J Vet Parasitol 2004; 18(2): 181-182 (Persian).
35. Akhtardanesh B, Radfar MH, Voosough D, Darijani N. Seroprevalence of canine heartworm disease in Kerman, southeastern Iran. Comp Clin Pathol 2011; 20: 573-577.
36. Khedri J, Radfar MH, Borji H, Azizzadeh M, Akhtardanesh B. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with Review of disease distribution. Iran J Parasitol 2014; 9(4): 560-567 (Persian).
37. Salahi-Moghadam A, Moobedi A, Bani Hashemi SJ. Case report of *Dirofilaria* in Hydrocoel of a child with 5 years old age, 3rd National Congress of Parasitilogy. Mazandaran university of medical sciences. sari, Iran. 2000.
38. Mobedi I, Javadian E, Ebaei MR. Introduction of Zoonosis Focus of canine Heartworm (Nematoda, Filarioidae, Dirofilaria immitis) in Meshkin-Shahr Region. Proceeding of National Congress of Iranian Veterinary Students, Tehran, 2000.
39. Azari-Hamidian SH, Yaghoubi Ershadi MR, Javadian E, Moubedi I, Abai MR. Review of Dirofilariasis in Iran. J Med Fac Guilan Univ Med Sci 2007; 15(60): 102-113 (Persian).
40. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scoot AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primer and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg 2005; 73(5): 895-900.
41. Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Dominguez-Alpizar JL. Description between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet Parasitol 2006; 135(3-4): 303-314.
42. Simsek S, Utuk AE, Koroglu E, Rishniw M. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. J Helminthol 2008; 82(2): 181-186.
43. Simon F, Morchon R, Gonzalez-Migoel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M. What is new about animal and human dirofilariasis? Trends Parasitol 2009; 25(9): 404-409.
44. Hou H, Shen G, Wu W, Gong P, Liu Q, You J, et al. Prevalence of dirofilaria immitis infection in dogs from Dandong, China. Vet Parasitol 2011; 183(1-2): 189-193.
45. Furtado AP, Do Carmo ES, Giese EG, Vallinoto ACR, Lanfred RM, Santos JN. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. Parasite Res 2009; 105(6): 1509-1515.
46. Ciocan R, Darabus Gh, Jacsó O, Fok E. Detection of *Dirofilaria* spp. in Dogs by PCR. *Bulletin* UASVM Vet Med 2010; 67(2): 40-44.
47. Song KH, Lee SE, Hayasaki M, Shiramizu K, Kim DH, Cho KW. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. Vet

www.SID.ir

Archive of SID

Parasitol 2003; 114(3): 231-236.

48. Ranjbar-Bahadori Sh, Eslami A, Meshgi B, Mohtasham MR. Study on blood filaria of dogs in Tonekabon. J Fac Vet Med Tehran Univ 2005; 60(4): 353-356 (Persian).
49. Ranjbar-Bahadori Sh, Eslami A. Prevalence of blood filaria of dogs in Golestan province and determining of its periodicity. J Fac Med Vet Univ Tehran 2006; 62(1): 11-14 (Persian).
50. Oncel T, Vural G. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs in Istanbul and Izmir. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29(3): 785-789.
51. Duran-Struck R, Jost C, Hernandez AH. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic)-June 2001. Vet Parasitol 2005; 133(4): 323-327.
52. Montoya JA, Morales M, Juste MC, Banares A, Simon F, Genchi C. Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. Parasitol Res 2006; 100(1): 103-105.
53. Yildirim A, Ica A, Atalay O, Duzlu O, Inci A. Prevalence and epidemiological aspects of Dirofilaria immitis in dogs from Kayseri Province, Turkey. Res Vet Sci 2007; 82(3): 358-363.
54. Boonyapakorn C, Srikitjakarn L, Morakote N, Hoerchner F. The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai University Small Animal Hospital, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2008; 39(1): 33-38.
55. Tasić A, Rossi L, Tasić S, Miladinović-Tasić N, Ilić T, Dimitrijević S. Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. Parasitol Res 2008; 103(6): 1297-1302.
56. Furtado AP, Do Carmo ES, Giese EG, Vallinoto AC, Lanfredi RM, Santos JN. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. Parasitol Res 2009; 105(6): 1509-1515.
57. Byeon KH, Kim BJ, Kim SM, Yu HS, Jeong HJ, Ock MS. A serological survey of *Dirofilaria immitis* infection in pet dogs of Busan, Korea, and effects of chemoprophylaxis. Korean J Parasitol 2007; 45(1): 27-32.
58. Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G. A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. Vet Parasitol 2001; 102(3): 243-252.
59. Souza NF, Benigno RNM, Figueiredo M, Salim SK, Silva D, Goncalves R, et al. (1997) Prevalence of in dogs in the city of Belm, Para, assessed on the basis of microfilaraemia. Rev Brasil de Parasitol Vet 1997; 6(1): 83-86.

www.SID.ir