

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

Mahdi Hosseinzadeh Varjoy¹,
Javad Ashrafi Helan²,
Nasrin Salehi³,
Ahad Bazmani⁴,
Ahmad Nematollahi²,
Abbas Imani Baran³

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

تشخیص مولکولی و ارزیابی جنبه های اپیدمیولوژیکی *دایروویلاریا* *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: *دایروویلاریا ایمی تیس* یکی از مهم ترین نماتودهای بیماری زای مشترک بین انسان و گوسفند، به ویژه سگ، بوده و باعث بیماری زئونوز *دایروویلاریازیس* در انسان و سگ می شود. تشخیص آلودگی عمدتاً از طریق روش های مختلف میکروسکوپی و سرولوژیکی و اخیراً به روش مولکولی انجام می شود. هدف از مطالعه حاضر برآورد دقیق آلودگی انواع سگ ها در شهرستان تبریز و حومه به *دایروویلاریا ایمی تیس* با استفاده از روش مولکولی و تعیین فاکتورهای خطر اپیدمیولوژیکی مؤثر در شیوع آلودگی بود.

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

یافته ها: از ۱۲۱ نمونه خون اخذ شده، ۱۴ نمونه (۱۱/۶ درصد) عمدتاً سگ گله) از نظر *دایروویلاریا ایمی تیس* مثبت بودند. در آنالیز آماری داده ها، صرفاً شیوع آلودگی بر اساس مناطق مختلف جغرافیائی ($p=0/036$) دارای اختلاف معنی دار بود.

استنتاج: علی رغم پیشرفت های چشمگیر در کنترل و پیشگیری بیماری های انگلی، آلودگی به *دایروویلاریا ایمی تیس* در جمعیت سگ های استان آذربایجان شرقی هم چنان وجود دارد و توصیه می شود یک توجه ویژه توسط صاحبان دام و مسئولین بهداشتی در ارتباط با حفاظت سگ ها در برابر آلودگی به این انگل مهم و حیاتی انتقال آن به جوامع انسانی مبذول شود.

واژه های کلیدی: *دایروویلاریا ایمی تیس*، *دایروویلاریازیس*، شیوع مولکولی، سگ، تبریز

مقدمه

دایروویلاریا ایمی تیس از بیماری زاترین نماتودهای قلبی-ریوی سگ سانان و گربه سانان، به نام *دایروویلاریازیس*، می باشد. انگل تحت عنوان کرم قلب

دایروویلاریا ایمی تیس از بیماری زاترین نماتودهای قلبی-ریوی سگ سانان و گربه سانان، به نام *دایروویلاریازیس*، می باشد. انگل تحت عنوان کرم قلب

مؤلف مسئول: عباس ایمانی باران - تبریز، جاده باسمنج، روبروی شهرک خاوران، دانشکده 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

سگک در بطن راست و شریان‌های ریوی سگک‌سانان (میزبانان طبیعی) زندگی می‌کند و از طریق گزش بیش از ۷۰ گونه پشه منتقل می‌شود. آلودگی عمدتاً در سگک‌های بالای یک سال رخ می‌دهد (۱-۳). بیماری‌زائی، آسیب‌شناسی و تظاهرات بالینی دایروفلاریازیس به لحاظ اهمیت فوق‌العاده بیماری توسط محققان زیادی با تمام جزئیات در تمام نقاط دنیا بررسی شده‌اند (۵،۴). به طور مختصر، مهم‌ترین علائم بالینی دایروفلاریازیس در سگک عبارت از سرفه 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 سگک، یکی از زئونوزهای مطرح بین انسان و گوشتخواران در مناطق معتدل، گرمسیر و نیمه گرمسیر دنیاست (۷). انسان اگر چه میزبان تصادفی برای دایروفلاریا ایمی‌تیس محسوب می‌شود، ولی دایروفلاریوزیس ریوی و نیز عفونت‌های اکتوییک بارها از انسان گزارش شده‌اند. تا به حال بیش از ۱۷۰۰ مورد انسانی دایروفلاریازیس (از جمله بیش از ۳۷۰ مورد ریوی) در سرتاسر دنیا به ثبت رسیده است و این نشان می‌دهد که هر کجا دایروفلاریازیس سگک‌سانان وجود دارد، انسان‌ها نیز در معرض خطر آلودگی قرار دارند. بیش‌تر عفونت‌های انسانی، بدون نشانی هستند. انگل ضایعات سگک‌ای شکل را، که از اهمیت پاتولوژیکی پائینی برخوردار است، در ریه ایجاد می‌کند (۲، ۱۳-۸). به طور کلی، ضایعات علی‌رغم خوش‌خیم 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 (تراکتوتومی و بیوپسی) و درمان شوند (۱، ۱۴). علاوه بر این، جراحات قلبی - عروقی، عفونت‌های داخل چشمی و پشت چشمی، عفونت‌های حفره صفاقی، چادرینه، اندام‌های جنسی نر و موارد نادری از منگوانسفالیت از

انسان گزارش شده‌اند (۱۵). در ایران دایروفلاریا ایمی‌تیس از سگک، روباه، شغال، گرگ و گربه گزارش شده است. تا به حال، آلودگی سگک‌ها از استان‌های آذربایجان شرقی (۱۹-۱۶)، آذربایجان غربی (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 درصدهای مختلف شیوع گزارش شده است. موارد انسانی دایروفلاریازیس ناشی از دایروفلاریا ایمی‌تیس از استان‌های هرمزگان (۳۷)، اردبیل (۳۸) و گلستان (۳۹) از اندام‌های مختلف افراد آلوده به ثبت رسیده‌اند. آلودگی با فیلرها در سگک‌سانان به دلیل آسیب بالقوه 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 و تعیین شیوع دایروفلاریازیس بر پایه شناسائی میکروسکوپی 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 گمراه‌کننده هستند (از جمله آلودگی مخفی و درمان با ضد انگل‌های ماکرولیدی). هم‌چنین روش‌هایی مانند رادیوگرافی، کاردیوگرافی، هیستوشیمی، ایمونوهیستوشیمی و ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص دایروفلاریا ایمی‌تیس کمک‌کننده هستند، ولی روش‌های تشخیصی مؤید و معتبر در بیماری کرم قلب تست‌های سرولوژیکی و مولکولی می‌باشند. چندین کیت تجاری الیزا برای تشخیص کرم قلب در سگک‌ها در دسترس هستند، ولی این کیت‌ها به دلایل متعددی قابلیت استفاده در مقیاس وسیع را ندارند. امروزه روش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای

سگ، ۲ سی سی 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 4°C به مرکز بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز واقع در بیمارستان سینا انتقال داده شدند و تا زمان استفاده در 20°C - ذخیره شدند.

آزمایش میکروسکوپی نمونه‌های خون برای مشاهده میکروفیلر *دایروفیلاریا ایمی تیس*

بعد از اتمام مرحله نمونه‌برداری، نخست آزمایش میکروسکوپی بر روی نمونه‌های خون برای مشاهده میکروفیلرهای *دایروفیلاریا ایمی تیس* صورت گرفت. بدین منظور با استفاده از روش تکمیل شده‌ی نات یک سانتی متر مکعب خون با ۹ سانتی متر 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 سانتیفریژ شد و پس از تخلیه 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 ایمی تیس*

در این مرحله، استخراج DNA *دایروفیلاریا ایمی تیس* 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 مشخصات زیر:

Dir im16 F: GCATCTT AGAACTT GGTCC ATCC
Dir im16 R: CAAGGCGTATTTACCGCCGAC

برای تکثیر قطعه‌ای تقریباً به طول ۴۳۲ جفت باز از توالی ژنی (Partial ssu18S rRNA) 18S، طراحی و برای ساخت آن‌ها توسط شرکت زیست

پلی مرز 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 سرولوژیک بوده است. چون استان آذربایجان شرقی یکی از کانون‌های زئونوتیک دایروفیلاریازیس در ایران می‌باشد (۳۹)، هدف از مطالعه 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 ایمی تیس* در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دام‌ها و نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی، از خردادماه سال ۱۳۹۰ تا تیرماه سال ۱۳۹۱، 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 آن‌ها 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، ۲-۴ 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 پلی‌مرز (PCR) از هر قلاده

فناوری کوثر سفارش داده شد. هم چنین 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 آن‌ها 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 هر کدام از پرایمرها، ۲۵۰ میلی مول dNTPs، ۵ واحد آنزیم *TaqDNA* 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 $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، که بعداً با $40^{\circ}C$ چرخه به ترتیب واسرشت در $94^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در $63^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر در $72^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه دنبال شد. یک مرحله تکثیر نهائی در $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه نیز انجام شد.

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

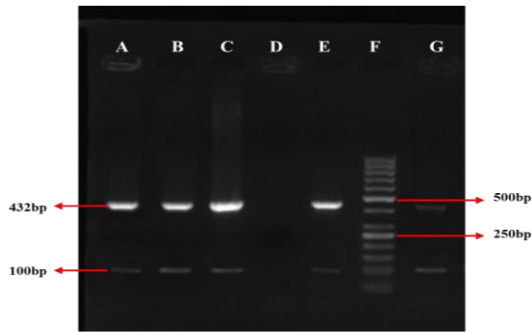
آنالیز آماری داده‌ها

در این تحقیق سگ‌ها براساس کاربری، سن، جنس، نژاد و منطقه جغرافیائی برای تعیین ارتباط این شاخص‌ها با شیوع آلودگی با *دایروفلاریا 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.

یافته‌ها

در بررسی میکروسکوپی یک مبتنی بر روش تکمیل شده‌ی نات (Knott) بر روی ۱۲۱ نمونه خون، مواردی از آلودگی با میکروفیلر *دایروفلاریا 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 شده 432bp بر روی ژل آگارز متعاقب الکتروفورز محصولات PCR (تصویر شماره ۱)، از نظر آلودگی با *دایروفلاریا ایمی‌تیس* مثبت بودند. از نظر پراکنندگی جغرافیائی، بالاترین درصد آلودگی متعلق به روستاهای واقع در شمال غربی (۳۳/۳ درصد) و پائین‌ترین آن مربوط به شهر تبریز و روستاهای واقع در جنوب شرقی (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 بقیه 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 *دایروفلاریا ایمی‌تیس*



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

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 پراکنندگی آلودگی به *دایروفلاریا* / ایمی تیسی 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.

جدول شماره ۱: میزان آلودگی با *دایروفلاریا* / ایمی تیسی بر اساس پراکنندگی و کاربری سگ‌ها در مناطق مختلف شهرستان تبریز

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

جدول شماره ۲: میزان آلودگی با *دایروفلاریا* / ایمی تیسی بر اساس جنسیت در کاربری و پراکنندگی جغرافیایی (به تفکیک روستا)

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

جدول شماره ۳: میزان آلودگی با *دایروفلاریا* / ایمی تیسی بر اساس سن و نژاد

سن	بر اساس سن*			بر اساس نژاد		
	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی (درصد)	تعداد نمونه	نوع نژاد	تعداد مثبت (درصد)	تعداد منفی (درصد)
زیر ۲ سال	۳۸	(۷/۹)۳	۴۸	بومی	(۹۲/۱)۳۵	(۸۴/۳)۷۰
۲-۴ سال	۳۰	(۱۳/۳)۴	۳۸	مخلوط	(۸۶/۷)۲۶	(۹۷/۴)۲۷
بالای ۴ سال	۴۱	(۱۷/۱)۷	۱۲۱	کل نمونه	(۸۲/۹)۳۴	(۸۸/۴)۱۰۷
کل نمونه	۱۰۹	(۱۲/۸)۱۴	۱۲۱			

* سن ۱۲ قلاده قابل تخمین نبود.

بحث

مطابق با شواهد موجود، استان آذربایجان شرقی یکی از کانون‌های زئونوز برای دایروفلاریازیس ناشی از *دایروفلاریا ایمی تیس* 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 آذربایجان شرقی می‌باشد (۱۹-۱۶، ۴۳). علی‌رغم جهانی بودن بیماری دایروفلاریازیس 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 سرولوژیکی و مشاهده میکروسکوپی میکروفیلر در خون بوده‌اند و از روش‌های دقیق و اختصاصی مولکولی در بررسی‌های شیوع دایروفلاریازیس 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 آذربایجان شرقی (۱۹)، مطالعه‌ای جامع مبتنی بر روش مولکولی به چشم نمی‌خورد.

در مطالعه حاضر که بر اساس یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های تشخیصی موجود به انجام رسید، میزان آلودگی به *دایروفلاریا ایمی تیس* در بین جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۱/۶ درصد برآورد شد. در بررسی میکروسکوپی و مولکولی برای برآورد شیوع *دایروفلاریا ایمی تیس* 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 دایروفلاریازیس 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 *دایروفلاریا ایمی تیس* بودند (۴۶). در مطالعه‌ای مشابه در استان آذربایجان شرقی (۱۹)، اگر چه میزان شیوع *دایروفلاریا ایمی تیس* ۲۶/۳ درصد گزارش شد، ولی به نوع، جنس و سن سگ‌های مورد مطالعه اشاره نشده است. یکی از اساسی‌ترین شاخصی که در مطالعه حاضر برای برآورد میزان آلودگی *دایروفلاریا ایمی تیس* در نظر گرفته شد، انواع کاربری سگ‌ها بود که همین معیار مهم احتمالاً دلیلی برای تفاوت در میزان شیوع دایروفلاریازیس در دو مطالعه مشابه در یک حوزه می‌باشد، به طوری که در مطالعه فعلی، بیش‌ترین جمعیت سگ‌ها از نظر کاربری مربوط به سگ‌های گله بود (۳/۶۵ درصد) و ضمناً بالاترین میزان آلودگی نیز در بین همین سگ‌ها مشاهده گردید (۷/۹۲ درصد). شیوع *دایروفلاریا ایمی تیس* 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)، جابجایی دام‌ها، تجارت بین‌المللی و برنامه‌های نظارتی و کنترلی متغیر است (۲۳، ۳۲). در بررسی سرولوژیکی و مولکولی *دایروفلاریا ایمی تیس* در سگ‌های ولگرد و صاحب‌دار برخی مناطق ترکیه، علی‌رغم مثبت بودن ۱۲/۸ درصد سگ‌ها در بررسی شیوع سرمی دایروفلاریازیس، ولی هیچ‌کدام از سگ‌ها از نظر مولکولی آلودگی *دایروفلاریا ایمی تیس* را از خود نشان ندادند و بیش‌ترین شیوع سرمی دایروفلاریازیس مربوط به سگ‌های ولگرد بود (۴۲)، در صورتی که در مطالعه مشابه سرولوژیکی و مولکولی دایروفلاریازیس در مجارستان، ۴/۲۵ درصد سگ‌های آلوده به طور مشترک در نتایج سرولوژیکی و مولکولی آلودگی با گونه *دایروفلاریا رینس* را نشان دادند (۴۷). از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در شیوع دایروفلاریازیس جمعیت مطلوب پشه‌های ناقل است (۴۲).

در بررسی دایروفلاریازیس در کره نشان داده شد که شیوع بیماری در مناطق ساحلی به مراتب بیش تر از مناطق کوهستانی و شهری می باشد (۴۸). همین طور، رنجبر بهادری و همکاران (۲۳) نشان دادند که نواحی ساحلی شمال ایران به دلیل شرایط آب و هوایی مساعد برای حضور گونه های متعدد پشه های ناقل و وفور سگ های ولگرد و گوشت خواران وحشی، بیش ترین شیوع دایروفلاریازیس را نسبت به نواحی دیگر دارد.

در مطالعه مشابه قبلی که فقط در مناطق شمالی استان آذربایجان شرقی انجام شده است، شیوع آلودگی با دایروفلاریا /یمی تیس ۵۷/۴ درصد نشان داده شد (۱۹) و در مطالعه حاضر نیز شیوع دایروفلاریازیس 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 می تواند به این دلیل باشد که این مناطق به سبب دارا بودن منابع غنی و متنوع آبی و گیاهی، مناسب ترین مکان برای حضور انواع پشه هاست، در صورتی که مناطق مرکزی و جنوبی استان آذربایجان شرقی به لحاظ منابع آبی و گیاهی در حد متوسط بوده و عمدتاً مناطق کوهستانی هستند و دارای مراتع فراوان برای پرورش گوسفند می باشند و با توجه به ویژگی های محیطی به نظر می رسد این مناطق جغرافیائی محیط چندان مناسبی برای زیست پشه های ناقل نیست. لازم به ذکر است که در عمده مطالعات مشابه اظهار شده است که آیا تغییرات محسوس در جهت کاهش، به علت اختلافات نمونه برداری تصادفی، اختلافات در شیوه بررسی و یا کاهش واقعی در شیوع می باشد یا خیر کاملاً نامعلوم است (۴۲).

بر اساس نتایج حاصله، آلودگی دایروفلاریا /یمی تیس در مناطق مختلف شهرستان تبریز متفاوت بود ($p = 0/036$). این یافته موافق با نتایج مطالعه مشکگی و همکاران (۱۷) و مغایر با نتایج مطالعات دیگر در برخی مناطق ایران (۳۱، ۲۷) می باشد. اگر چه بیش ترین شیوع مربوط به گروه سنی بالای ۴ سال بود، ولی بین شیوع آلودگی

و سن، ارتباط معنی داری از نظر آماری مشاهده نگردید و این یافته با نتایج مطالعات دیگران (۱۸، ۱۹، ۲۳، ۲۷، ۳۱، ۴۹، ۵۰) کاملاً هم خوانی داشت، در صورتی که در برخی مطالعات (۷، ۱۷، ۲۲، ۲۴، ۳۲، ۴۸، ۵۴-۵۱) ارتباط معنی دار گزارش شده اند. افزایش تدریجی شیوع آلودگی توأم با افزایش سن سگ ها ناشی از گزش بیش تر توسط پشه ها، شرایط آلوده کننده طی سال های بیش تر زندگی، حضور طولانی مدت میکروفلیر در خون، عدم ایمنی زائی کافی در برابر انگل بالغ بیان شده است (۲۸، ۲۹).

در این مطالعه شیوع آلودگی بین جنس های نر (۱۱/۵ درصد) و ماده (۱۱/۸ درصد) تقریباً برابر بود و چنین مشابهتی در بسیاری از پژوهش های صورت گرفته در ایران و سایر کشورها (۷، ۱۸، ۲۴-۲۶، ۲۷، ۳۱، ۳۲، ۳۵، ۴۲، ۴۹، ۵۳، ۵۷-۵۵) مشاهده می شود. با اندک تفاوتی که در مواردی شیوع آلودگی در بین سگ های نر مختصراً بیش تر گزارش شده است. بر عکس، در برخی مطالعات (۴۴، ۵۸، ۵۹) تفاوت آماری در شیوع آلودگی بین جنس ها با درصد بالا در بین سگ های نر توصیف شده است و دلیل آن را عمدتاً به تأثیر هورمون های جنسی بر آلودگی و تمایل بیش تر صاحبان برای نگهداری سگ های نر در بیرون از منازل برای حفاظت از امنیت و اموال نسبت می دهند (۴۸، ۶۰). از لحاظ کاربردی، در بین انواع سگ ها در مطالعه حاضر برای شیوع آلودگی اختلاف آماری یافت نشد. با این وجود، بیش ترین میزان آلودگی اختصاص به سگ های گله داشت. بیش تر مطالعات دخالت عامل کاربری (نوع) را در معنی دار بودن شیوع آلودگی بی تأثیر دانسته اند، با این حال گزارش کرده اند که سگ های ولگرد نسبت به سایر جمعیت سگ های مورد مطالعه، بیش ترین شیوع را از خود نشان دادند (۱۸، ۳۶). به نظر می رسد از دلایل اصلی بالا بودن شیوع آلودگی در بین سگ های گله (۵/۱۶ درصد) در مطالعه حاضر حجم بالای جمعیت سگ های گله می باشد. در شیوع آلودگی بین سگ های بومی و نژاد مختلط، تفاوت معنی داری در بین نژادهای

آذربایجان شرقی حضور دارد. توصیه می‌شود صاحبان دام و مسئولین امور بهداشتی، توجه اساسی در ارتباط با این بیماری در جهت کنترل و پیشگیری هم در بعد انسانی و هم در بعد حیوانی مد نظر قرار دهند.

سپاسگزاری

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

موجود در مطالعه حاضر وجود نداشت و در برخی مطالعات نیز بی‌تأثیر بودن این شاخص مشخص شده است (۵۰،۴۹،۳۲). امروزه همگام با پیشرفت‌های روز افزون بشر در تمامی زمینه‌ها، به ویژه بهداشت عمومی، به سبب ارائه راه کارهای کنترلی و پیشگیرانه دقیق، عملاً مشاهده می‌شود که طیف وسیعی از بیماری‌های مشترک و غیر مشترک ریشه‌کن شده‌اند و از آن‌ها صرفاً نامی در متون علمی بر جای مانده است، ولی همان‌گونه که نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، این بیماری مشترک انگلی هم‌چنان در این نقطه از ایران وجود دارد و به جز چند مطالعه محدود هیچ اقدامی در ارتباط با این بیماری صورت نگرفته است و در نتیجه دایروفیلاریازیس به صورت یک بیماری پنهان در بین سگ‌های استان

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.

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. Ettinger 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, Froggy 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. Dirofilariasis 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, Mohebbali 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, Hekmatkhan A. A study on filariosis 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 Oskoi 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.

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 Parasitology. Mazandaran university of medical sciences. sari, Iran. 2000.
38. Mobedi I, Javadian E, Ebai MR. Introduction of Zoonosis Focus of canine Heartworm (Nematoda, Filarioidea, *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 dirofilariasis in South Korea. *Vet*

- 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.