بررسی مقایسه ای شیوع آلودگی تک یاخته ای *آنتاموبا هیستولیتیکا* در سگ های خانگی

بهنام پدرام[*1]، رضا نقی ها نجف آبادی[2]، محمد محبی[3]، زهرا صادقیان[4]، فاطمه همایون[4]

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی ، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران
۲- گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۳- دانش آموخته عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران
٤- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

***نویسنده مسئول: b1peram@yahoo.com**

چکیده

با افزایش تعامل انسان و حیوانات خانگی، به‌ویژه سگ‌ها، بررسی بیماری‌های مشترک بین آن‌ها اهمیت روزافزونی یافته است. از جمله این بیماری‌ها، آلودگی به *Entamoeba histolytica* به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های تک‌یاخته‌ای، مورد توجه ویژه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه میزان شیوع این آلودگی در سگ‌های خانگی، با بهره‌گیری از دو روش گسترش مستقیم و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد. در این تحقیق، ۲۵ نمونه مدفوع از سگ‌های خانگی با سنین و جنسیت متفاوت جمع‌آوری و از نظر حضور انگل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نشان داد که ۷ نمونه مشکوک به آلودگی بودند، اما آزمون PCR اختلاف معناداری میان نمونه‌های مشکوک و سایر نمونه‌ها گزارش نکرد. یافته‌ها حاکی از آن است که شیوع آلودگی به *E.histolytica* در جمعیت مورد مطالعه قابل توجه نبوده و روشPCR ، به‌عنوان روشی دقیق‌تر و اختصاصی‌تر، می‌تواند در تشخیص مطمئن‌تر این انگل مؤثر واقع شود. نتایج این پژوهش می‌تواند در بهبود راهکارهای پیشگیری، تشخیص و کنترل بیماری‌های زئونوز مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: *Entamoeba histolytica* ، سگ خانگی، انگل، آلودگی تک‌یاخته‌ای، PCR

مقدمه

حیوانات خانگی نقش مهمی در زندگی و سلامت انسان ایفا می‌کنند و بهبود وضعیت سلامتی آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (۱). تعامل میان انسان و حیوان، می‌تواند اثرات مثبتی بر سلامت و رفاه انسان‌ها داشته باشد (۲). انسان‌ها مدت‌هاست متوجه شده‌اند که سگ‌ها می‌توانند از طرق مختلف برای دستیابی به اهداف مهم مفید باشند. این از اولین تعاملات شامل اهداف مشترک اجتناب از شکارچیان و به دست آوردن غذا، تا گنجاندن اخیر سگ‌ها در زمینه‌های مختلف از جمله محیط‌های درمانی و آموزشی مشهود است (۳). سگ‌ها با قدمتی حدود ۲۰ میلیون سال، توانسته‌اند با زندگی انسان‌ها در سراسر جهان سازگار شوند و امروزه علاوه بر نقش‌های تفریحی، جایگاه مهمی در ارتقای سلامت جسمی، روانی و اجتماعی انسان‌ها، به‌ویژه کودکان، دارند (۴،۵). ویژگی‌های رفتاری چون اطاعت‌پذیری و توانایی درک روان‌شناسی انسان، موجب پذیرش گسترده‌تر سگ‌ها به‌عنوان حیوان خانگی شده است (۶،۷). در بسیاری از کشورها، جدای از اهداف تفریحی یا همراهی، از سگ‌ها برای خدمت در بخش دفاع کشور نیز استفاده می‌شود، جایی که آنها نقشی محوری برای کشف جنایات و جنایتکاران دارند(۸).

با وجود شواهد گسترده درباره فواید سگ‌ها برای انسان، کمتر به تأثیر وضعیت سلامت سگ‌ها بر زندگی انسان پرداخته شده است. این در حالی است که اهمیت سلامت حیوانات روزبه‌روز بیش‌تر مورد توجه قرار می‌گیرد، چرا که ارتباط تنگاتنگی میان سلامت حیوانات و ارتقای سلامت عمومی انسان‌ها وجود دارد (۹). سگ‌ها یکی از رایج‌ترین حیوانات خانگی هستند که علاوه بر نقش عاطفی، در اپیدمیولوژی بیماری‌های مشترک انسان و حیوان نقش قابل توجهی ایفا می‌کنند (۱۰،۱۱). بیماری‌های تک‌یاخته‌ای انگلی نشان‌دهنده طیف قابل توجهی از بیماری‌های عفونی است که همه گونه‌های جانوری از جمله انسان را تهدید می‌کند (۱۲). در این میان، بیماری‌های تک‌یاخته‌ای روده‌ای از مشکلات مهم در سگ‌ها محسوب می‌شوند که به‌دلیل روش‌های متعدد انتقال از طریق آب و غذا، از شیوع بالایی برخوردارند (۱۳).

یکی از مهم‌ترین این بیماری‌ها آمیبیازیس است که ناشی از *Entamoeba histolytica*بوده و می‌تواند از عفونت بدون علامت تا بیماری‌های تهاجمی چون کولیت آمیبی و آبسه کبدی متغیر باشد (۱۴). مطالعات مختلف، وجود گونه‌های بیماری‌زای آنتاموبا را در سگ‌ها تأیید کرده‌اند. به‌عنوان نمونه، محمد و همکاران (۲۰۲۳) در عراق آلودگی میکروسکوپی و مولکولی *E. histolytica* را در ۴۲.۸٪ از سگ‌های خانگی گزارش کردند، که ۵۰٪ از آن‌ها با آزمون PCRنیز مثبت بودند. همچنین مشخص شد آلودگی در سگ‌های نر و در ماه‌های خاصی از سال شیوع بالاتری دارد. عباس و همکاران نیز در مصر، شیوع ۹/۸٪ این انگل را در بین انگل‌های روده‌ای مشترک با انسان در سگ‌ها گزارش کردند. مطالعات مشابه در تایوان، چین، مالزی و ایران نیز شواهدی

از حضور و شیوع *Entamoeba*در سگ‌ها ارائه کرده‌اند و بر لزوم بررسی این انگل از منظر زئونوز تأکید دارند (۲۴-۱۵)

مطالعات نشان داده‌اند که سگ‌ها ممکن است مخزن یا ناقل مکانیکی آمیبیاز انسانی باشند. همچنین اطلاعاتی درباره شیوع، عوامل خطر بالقوه و ارتباط مشترک عفونت آنتاموبا بین انسان و حیوان ارائه شد و بر لزوم مطالعات بیشتر برای درک انتقال و اهمیت بهداشتی این انگل تأکید گردید (۲۵). افتراق *E. histolytica*پاتوژن از گونه غیرپاتوژن *E. dispar*، به‌علت شباهت‌های مورفولوژیکی، نیازمند روش‌های پیشرفته تشخیصی همچون الایزا با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا PCR است. (۱۳،۱۴،۲۵،۲۶)

PCRبه‌عنوان یک روش حساس و دقیق، امکان شناسایی قطعات خاص DNA را فراهم ساخته و در تشخیص عفونت‌های انگلی و مطالعه اپیدمیولوژی بیماری‌های زئونوز کاربرد گسترده‌ای دارد (۲۷،۲۸،۲۹،۳۰). با توجه به اهمیت بیماری‌های مشترک انسان و حیوان و نقش سگ‌ها در انتقال عوامل زئونوز، مطالعه حاضر با هدف مقایسه شیوع آلودگی *Entamoeba histolytica*در سگ‌های خانگی با دو روش گسترش مستقیم و PCR طراحی گردیده است.با توجه به اهمیت بیماری‌های مشترک انسان و حیوان و نقش سگ‌ها در انتقال عوامل زئونوز، مطالعه حاضر با هدف مقایسه شیوع آلودگی آنتاموبا هیستولیتیکا در سگ‌های خانگی با دو روش گسترش مستقیم و PCR طراحی گردیده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی، با هدف بررسی آلودگی به انگل *Entamoeba histolytica*در سگ‌های خانگی، مجموعاً ۲۵ نمونه مدفوع (هرکدام به وزن ۱۰ تا ۱۵ گرم) از سگ‌های خانگی در سنین مختلف و از هر دو جنس، طی بازه زمانی مهر ۱۴۰۲ تا بهمن ۱۴۰۲ جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری به‌صورت هفتگی و از مناطق مختلف استان خوزستان انجام گردید. هدف از این نمونه‌گیری، تعیین شیوع آلودگی به *Entamoeba histolytica*با استفاده از روش‌های میکروسکوپی اسمیر مستقیم و روش‌های مولکولی بود.

برای بررسی انگل‌شناسی، از روش فلوتاسیون استفاده شد. این روش بر اساس تفاوت در وزن مخصوص تخم های انگل است. محلول های شناورسازی شامل سولفات روی، NaCl و Sheather's می باشد. از روش شناورسازی قندی شیتر (Sheather’s sugar flotation) جهت تغلیظ نمونه‌ها به‌منظور تشخیص اووسیست‌ها استفاده شد. محلول قندی با وزن مخصوص میانگین ۱.۲۰ تهیه گردید. حدود ۱ تا ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مدفوع که قبلاً از صافی گاز دو لایه عبور داده شده بود تا موکوس و ذرات اضافی جدا شوند، به لوله سانتریفیوژ منتقل و تا سه‌چهارم حجم آن با محلول قندی پر شد. پس از مخلوط کردن کامل، لوله به‌مدت ۳ دقیقه در ۵۰۰g سانتریفیوژ گردید. اووسیست‌های جمع‌آوری شده از لایه سطحی، دو تا سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شسته شده و

سپس با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی‌های ۱۰×، ۴۰× و ۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت از نظر وجود اووسیست، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آنالیز مولکولی بعدی نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی از اووسیست‌های تغلیظ و شسته‌شده با استفاده از روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل بر اساس دستور بوم و همکاران[1] انجام شد. حدود ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ‌شده به داخل میکروتیوب ۱.۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی، ۲۵۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (lysis buffer) افزوده و به‌خوبی مخلوط شد. سپس با۱۴۰۰۰g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده اضافه و کاملا با رسوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون ۱۰ مرتبه در نیتروژن مایع منجمد و در بن ماری ۶۰ درجه سانتیگراد (جهت سست شدن دیواره سلول) ذوب گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K از محلول ذخیره (ml/mg1) به لوله اضافه شده و کاملا مخلوط و به مدت یک شب در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد (جهت هضم پروتئینها و اتصالات بین سلولی) انکوبه شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) به لوله اضافه کرده و لوله به آرامی یک دقیقه سر و ته شد. سپس به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شده، آنگاه مایع رویی برداشته و به لوله تمیز انتقال داده شد. هم حجم فاز شفاف جدا شده روی لوله محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه و لوله به آرامی سر و ته شده، سپس در ۱۰۰۰g به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ (جهت حذف مولکولهای فنل)گردید. مایع رویی به لوله تمیزی انتقال داده شده و سپس ۵۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول رسد به آن اضافه شد. اتانول باعث آبگیری منونه و رسوب DNA میگردد. لوله حاوی DNA به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر-۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته، سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت چند ثانیه با سرعت بالا سانرتیفوژ شد تا رسوب شستشو داده شود. اتانول بطور کامل خالی شده و درب لوله ۵-۱۰ دقیقه باز گذاشته شد تا اتانول تبخیر گردد. سپس رسوب خشک شده در ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به خوبی حل گردید و محلول حاصل تا هنگام استفاده جهت PCRدر دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

برای جداسازی و تأیید انگل‌های *Entamoeba histolytica*و گونه‌های آن، واکنش‌های PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. پرایمرها به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت Macrogen (کره) تهیه و در آب با خلوص بالا حل شدند تا غلظت نهایی ۱۰۰ پیکومول/میکرولیتر به‌عنوان آغازگر حاصل شود. این پرایمرها تا زمان استفاده، در غلظت

1-Boom

۰.۵ پیکومول در ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مستر میکس توسط **AccuPower® PCR PreMix**تهیه شد. محتویات لوله پیش‌مخلوط شامل ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۲۵۰ میکرومول dNTPs، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۳۰ میلی‌مول KCl، ۱.۵ میلی‌مول $MgCl_2$، پایدارکننده و رنگ بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA استخراج‌شده، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (فوروارد و ریورس) انجام شد.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Mygenecompany (کره جنوبی) بر اساس برنامه حرارتی زیر انجام شد: ابتدا دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها (Annealing) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله طویل‌سازی (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. در پایان، یک مرحله کشش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد و نتایج زیر نور UV مشاهده گردید.

تجهیزات و مواد مصرفی کلیدی مورد استفاده در این مطالعه شامل ظروف جمع‌آوری مدفوع، محلول شناورسازی قندی شتر، میکروسکوپ نوری، نرمال سالین، پیپت پاستور، نیتروژن مایع، اتانول، سدیم استات، معرف‌های Master Mix، پرایمرهای Forward وReverse ، ترموسایکلر، سانتریفیوژ، سیستم PCR ریل تایم، هیتر بلاک، تانک الکتروفورز، منبع تغذیه برق، میکروپیپت و دستگاه ترانس‌ایلومیناتور بود.

تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس از آن آزمون تعقیبی توکی (Tukey’s post hoc test) انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM)ارائه گردید. مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنادار تلقی شدند. ترسیم نمودارها با نرم‌افزا Microsoft Excel انجام شد.

سایز قطعه تکثیر شده (bp)	توالی پرایمر	نام انگل
۹۰۰	5'TAAGATGCACGAGAGCGAAA3' (forward primer) 5'GTACAAAGGGCAGGGACGTA3' (reverse primer)	*آنتاموبا هیستولیتیکا*

جدول ۱: پرایمرها به همراه سکانس و سایز

نتایج

شماره نمونه	جنس	سن	جنسیت
۱	بومی	۴سااله	نر
۲	بومی	۳ساله	نر
۳	بومی	۲ساله	نر
۴	بومی	۵ماهه	نر
۵	بومی	۶ماهه	ماده
۶	بومی	۳ساله	ماده
۷	بومی	۲ساله	نر
۸	دوبرمن	۵ساله	نر
۹	بومی	۳ساله	ماده
۱۰	میکس باست هونه و اسپیتنر	۴ساله	نر
۱۱	اسپیتنر	۲ساله	نر
۱۲	شیتزو	۴ ساله	ماده
۱۳	میکس گلدن و اشپینر	۴ساله	نر
۱۴	ژرمن بلک	۷ساله	نر
۱۵	حمایتی	۲ساله	نر
۱۶	پیتبول	۴ساله	نر
۱۷	شیتزو	۲ساله	ماده
۱۸	امریکن بولی	۱سال و ۵ ماه	ماده
۱۹	شیتزو ترییر	۱ساله	نر
۲۰	شیتزوکراس	۱ سال و نیم	ماده
۲۱	شیتزو	۴ ماهه	ماده
۲۲	هاسکی	۸ ماهه	نر
۲۳	بومی	۲ ساله	ماده
۲۴	ژرمن	۳ ساله	ماده
۲۵	بومی	۱ ساله	نر

جدول ۲: مشخصات سگ های مورد بررسی

شکل زیر نمای میکروسکوپی نمونه‌های مشکوک به انگل را نشان می‌دهد. بررسی میکروسکوپی نمونه‌های مدفوع نشان داد که از میان ۲۵ نمونه بررسی‌شده، ۷ نمونه (۲۸٪) دارای ویژگی‌های مشکوک به آلودگی بودند.

از میان نمونه‌های مشکوک، ۴ مورد (۵۷٪) مربوط به سگ‌های ماده و ۳ مورد (۴۳٪) مربوط به سگ‌های نر بودند. همچنین، ۴ نمونه (۵۷٪) از این موارد مشکوک متعلق به سگ‌های بومی بودند.

در کل، ۱۵ نمونه (۶۰٪) از مجموع نمونه‌ها مربوط به سگ‌های نر و ۱۰ نمونه (۴۰٪) به سگ‌های ماده اختصاص داشت. از نظر سنی، ۱۴ مورد (۵۶٪) از سگ‌ها ۲ ساله یا کمتر و ۱۱ مورد (۴۴٪) بالای ۲ سال بودند. همچنین، ۱۱ نمونه (۴۴٪) از سگ‌ها دارای منشأ بومی گزارش شدند.

شکل۱ بررسی میکروسکوپی نمونه های مشکوک به انگل

نتایج بررسی ماکروسکوپی نشان داد که از بین ۷ نمونه مشکوک، همگی از نظر PCR منفی بودند.

شکل ژل نمونه های مشکوک به همراه کنترل منفی و مثبت و لدر را نشان داد.

بحث و نتیجه گیری

E.histolytica یک انگل فرصت‌طلب است که می‌تواند باعث بیماری‌های روده‌ای و خارج‌روده‌ای در انسان شود (۳۱, ۳۲). عفونت معمولاً از طریق راه دهانی-مدفوعی منتقل شده و کیست آن در شرایط محیطی سخت زنده می‌ماند (۳۴). گرچه بیشتر موارد بدون علامت هستند، ولی عفونت‌های تهاجمی می‌توانند خطرناک و حتی کشنده باشند (۳۵). در درمان، داروهای نیتروایمیدازول رایج هستند، اما می‌توانند عوارض سمی ایجاد کنند (۳۶).

آمیبیازیس در سراسر جهان انتشار دارد، اما عفونت در کشورهای در حال توسعه گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع تر است. عفونت‌ها در یتیم‌خانه‌ها، مؤسسات اصلاحی، پناهگاه‌ها، و زندان‌ها با افرادی که به صورت گروهی زندگی می‌کنند، مستعد بروز می‌شوند. یا مهاجران از مناطق اندمیک در معرض خطر بالاتری هستند (۳۷). ارتباط نزدیک انسان با حیوانات خانگی، به‌ویژه سگ‌ها، می‌تواند انتقال مشترک بیماری‌های انگلی را تسهیل کند(۳۸،۳۹)

اگرچه پاسخ‌های ایمنی در برابر این انگل در میزبان ایجاد می‌شود، شواهدی از ایمنی بلندمدت در انسان مشاهده نشده است. وجود IgE و IgG اختصاصی و واکنش‌های آنافیلاکتیک، نشانگر نقش سیستم ایمنی در روند بیماری است (۴۰)

در این مطالعه، با استفاده از دو روش مستقیم میکروسکوپی وPCR ، به بررسی آلودگی *E. histolytica* در سگ‌های خانگی پرداختیم. با وجود مشکوک بودن برخی نمونه‌ها در بررسی میکروسکوپی، تمامی آن‌ها در تست PCR منفی گزارش شدند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که شیوع این انگل در سگ‌های مورد بررسی پایین است و PCR دقت بالاتری در تشخیص دارد.مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که تشخیص میکروسکوپی نمی‌تواند گونه‌های مختلف *Entamoeba*را از هم تفکیک کند (۴۱, ۴۲)، در حالی که روشPCR ، به‌ویژه با استفاده از تکنیک‌های جدید، حساسیت و اختصاصیت بالاتری دارد و ابزار مناسبی برای تشخیص قطعی *E.histolytica* در نمونه‌های مدفوع محسوب می‌شود (۴۳،۴۴)

نتیجه‌گیری نهایی

شیوع *E.histolytica* در سگ‌های خانگی پایین گزارش شد و هیچ یک از نتایج بررسی‌ها از نظر آماری معنادار نبود. روش PCR به‌عنوان ابزار تشخیص دقیق‌تر، توانست نتایج مشکوک میکروسکوپی را رد کند.

منابع

۱. اصفهانی عا, قربانی غ, آثاری ش. میزان شیوع انگلهای روده‌ای در پرسنل نیروی دریایی سپاه پاسداران در سال ۱۳۸۵. طب نظامی. ۲۰۲۲;۸(۳):۱۹۷-۲۰۳.

2. Abbas I, Baghdadi HB, Rizk MA. Gastrointestinal Parasites of Dogs in Egypt: An Update on the Prevalence in Dakahlia Governorate and a Meta-Analysis for the Published Data from the Country. 2023;13(3).
3. Ai S, Zhang Z, Wang X, Zhang Q, Yin W, Duan Z. The first survey and molecular identification of Entamoeba spp. in farm animals on Qinghai-Tibetan Plateau of China. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2021;75:101607.
4. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology. 2000;25(2):169-93.
5. Clark CG. Methods for the investigation of diversity in Entamoeba histolytica. Archives of medical research. 2006;37(2):258-62.
6. Clark CG. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. Entamoeba dispar, an organism reborn. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1998;92(4):361-4.
7. Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of Entamoeba spp. Infection, Genetics and Evolution. 2019;75:104018.
8. Delialioglu N, Aslan G, Sozen M, Babur C, Kanik A, Emekdas G. Detection of Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004;99(7):769-72.
9. Dohoo IR, McDonell WN, Rhodes C, Elazhary YL. Veterinary research and human health. The Canadian Veterinary Journal. 1998;39(9):548.
10. Dos Santos Zanetti A, Malheiros AF. Diversity, geographical distribution, and prevalence of Entamoeba spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. 2021;28:17.
11. Duranton C, Rödel HG, Bedossa T, Belkhir S. Inverse sex effects on performance of domestic dogs (Canis familiaris) in a repeated problem-solving task. Journal of Comparative Psychology. 2015;129(1):84.
12. Gee NR, Rodriguez KE, Fine AH, Trammell JP. Dogs SuppoPCRing Human Health and Well-Being: A Biopsychosocial Approach. Front Vet Sci. 2021;8:630465.
13. Gillespie S, Bradbury RS. A Survey of Intestinal Parasites of Domestic Dogs in Central Queensland. Trop Med Infect Dis. 2017;2(4).
14. Haque R, Ali I, Akther S, Petri Jr WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. Journal of clinical microbiology. 1998;36(2):449-52.

15. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri Jr WA. Amebiasis. New England journal of medicine. 2003;348(16):1565-73.
16. Haque R, Kress K, Wood S, Jackson TF, Lyerly D, Wilkins T, et al. Diagnosis of pathogenic Entamoeba histolytica infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. Journal of Infectious Diseases. 1993;167(1):247-9.
17. Hashemzade Farhang h. Evaluation of the prevalence of intestinal protozoa in dogs of Tabriz city. Veterinary Clinical Pathology The QuaPCRerly Scientific Journal. 2018;12(2 (46) Summer):105-11.
18. Hashemzadeh Farhang H. Evaluation of the prevalence of intestinal protozoa in dogs of Tabriz city. Veterinary Clinical Pathology 2018;12(46):105-11.
19. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. PCR-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and immunity. 2005;6(4):279-84.
20. Islam O, Khatun S, Azad S, Famous M, Uddin M. Prevalence of different diseases of dogs recorded at central veterinary hospital, dhaka, bangladesh. Res J Vet Pract. 2019;7(9):53-7.
21. Kareem Kadhim D, Abdulsalam Hraija B, Aqeele G. Molecular-Genotyping Detection of Entamoeba histolytica in Diarrheic Patients. Arch Razi Inst. 2023;78(1):337-43.
22. Khodadadi A, Hamidi Nia MHN, Ghaforian M, Mohammadi Asl J. Evaluation of PCR Efficiency by the Use of Two Strategies: Standard Curve and Linear Regression. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2012;11(1):85-95.
23. Kow-Tong C, Chien-Jen C, Chiu J-P. A school waterborne outbreak involving both Shigella sonnei and Entamoeba histolytica. Journal of environmental health. 2001;64(4):9.
24. Lin F-H, Chen B-C, Chou Y-C, Chien W-C, Chung C-H, Hsieh C-J, et al. The Epidemiology of Entamoeba histolytica Infection and Its Associated Risk Factors among Domestic and ImpoPCRed Patients in Taiwan during the 2011–2020 Period. Medicina. 2022;58(6):820.
25. Lin FH, Chen BC, Chou YC, Chien WC, Chung CH, Hsieh CJ, et al. The Epidemiology of Entamoeba histolytica Infection and Its Associated Risk Factors among Domestic and ImpoPCRed Patients in Taiwan during the 2011-2020 Period. Medicina (Kaunas). 2022;58(6).
26. Lorenzini G, Tasca T, De Carli GA. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in PoPCRo Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2007;44(2):137-45.
27. MacGregor P, Nene V, Nisbet RER. Tackling protozoan parasites of cattle in sub-Saharan Africa. PLoS Pathogens. 2021;17(10):e1009955.
28. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. PCR in virology. Nucleic acids research. 2002;30(6):1292-305.
29. MaPCRins CF, Soares JP, CoPCRinhas A, Silva L, Cardoso L, Pires MA, et al. Pet's influence on humans' daily physical activity and mental health: a meta-analysis. Front Public Health. 2023;11:1196199.
30. McDowall S, Hazel SJ, Cobb M, Hamilton-Bruce A. Understanding the Role of Therapy Dogs in Human Health Promotion. Int J Environ Res Public Health. 2023;20(10).

31. Morf L, Singh U. Entamoeba histolytica: a snapshot of current research and methods for genetic analysis. Curr Opin Microbiol. 2012;15(4):469-75.
32. Nagata N, Shimbo T, Akiyama J, Nakashima R, Nishimura S, Yada T, et al. Risk factors for intestinal invasive amebiasis in Japan, 2003–2009. Emerging infectious diseases. 2012;18(5):717.
33. Ngui R, Hassan N-A, Nordin NMS, Mohd-Shaharuddin N, Chang LY, Teh CSJ, et al. Copro-molecular study of Entamoeba infection among the indigenous community in Malaysia: A first repoPCR on the species-specific prevalence of Entamoeba in dogs. Acta Tropica. 2020;204:105334.
34. Ngui R, Hassan N-A, Nordin NMS, Mohd-Shaharuddin N, Chang LY, Teh CSJ, et al. Copro-molecular study of Entamoeba infection among the indigenous community in Malaysia: A first repoPCR on the species-specific prevalence of Entamoeba in dogs. Acta Tropica. 2020;204:105334.
35. Obradović N, Lagueux É, Latulippe K, Provencher V. Understanding the Benefits, Challenges, and the Role of Pet Ownership in the Daily Lives of Community-Dwelling Older Adults: A Case Study. Animals (Basel). 2021;11(9).
36. Petri WA, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. Clinical infectious diseases. 1999;29(5):1117-25.
37. Petri WA, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. Clinical infectious diseases. 1999;29(5):1117-25.
38. RobePCRson I, Irwin P, Lymbery A, Thompson R. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. International journal for parasitology. 2000;30(12-13):1369-77.
39. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA, Jr., Haque R. PCRassay for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2168-72.
40. Russul bassim mohammed NIJ. Microscopic and Molecular Detection of Entamoeba species in Domastic dogs in Al-Diwaniyah Province. Journal of Survey in Fisheries Sciences. 2023;10(3):4415-24.
41. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. Veterinary parasitology. 2004;126(1-2):91-120.
42. Sharma M. Dogs, Breeding, Nutrition, Diagnosis, and Health Management: CBS Publishers & Distributors; 1996.
43. Trissl D. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev Infect Dis. 1982;4(6):1154-84.
44. Uddin MM, Talukder H, Islam O, Asaduzzaman M, Das M, Ahsan MI, et al. Magnitudes of diseases in dogs vary among different levels of age, gender, breed, and season: A hospital-based, retrospective cross-sectional study. Heliyon. 2021;7(11):e08287.

Comparative Study on the Prevalence of Entamoeba Histolytica Protozoan Infection in Domestic Dogs

Behnam Pedram[1]*, Reza Naghiha Najafabadi[2], Mohammad Mohbbi[3], Zahra Sadeghian[4], Fatemeh Homayoon[4]

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine graduate, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
4. Doctor of Veterinary Medicine student, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran

***Corresponding author: b1pedram@yahoo.com**

Abstract

With the increasing interaction between humans and domestic animals, especially dogs, the investigation of zoonotic diseases has gained growing importance. Among these diseases, infection with *Entamoeba histolytica* as one of the significant causes of protozoan infections has received special attention. The present study was conducted with the aim of evaluating and comparing the prevalence of this infection in domestic dogs using two methods: direct smear and polymerase chain reaction (PCR). In this study, 25 fecal samples were collected from domestic dogs of different ages and sexes and examined for the presence of the parasite. Microscopic examination showed that 7 samples were suspected of infection; however, the PCR test did not report any significant difference between the suspected samples and other samples. The findings indicate that the prevalence of *E. histolytica* infection in the studied population was not considerable, and PCR, as a more precise and specific method, can be effective in the more reliable diagnosis of this parasite. The results of this research can be useful in improving strategies for prevention, diagnosis, and control of zoonotic diseases.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, domestic dog, parasite, protozoan infection, PCR

.