Veterinary Clinical Pathology, Vol.17, No. 68, Winter 2024

Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2024.1984795.1413**

Comparison of oxidative stress between *Cytauxzoon feli* infected and healthy cats

Zafari, K.[1], Ghasemian, S.O.[2]*

1- Graduate of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.
*Corresponding authors email: ghasemian1249@yahoo.com
(Received: //Accepted: //)

Abstract

Cytauxzoonosis is an emerging infectious disease that affects feral as well as domestic cats. This disease is caused by apicomplexan protozoan parasites belonging to the genus Cytauxzoon. Evaluation of oxidative stress indicators can clarify the adverse effects of *Cytauxzoon felis* parasite on domestic cats. The present study aimed to investigate the prevalence of *C. felis* parasite in cats of Shahrekord, Iran and to evaluate oxidative stress indicators in cats infected with *C. felis* and compare it with healthy cats. This experimental study was conducted on blood samples of 100 cats that were referred to Shahrekord Veterinary Laboratory. Blood samples were taken in two separate test tubes for molecular analysis and determination of antioxidant parameters including catalase and lipid peroxidation. After collecting the samples, the PCR test was performed and oxidative stress markers were measured. The results of the present study showed that 3% of examined cats were infected with *C. felis*, and the level of catalase enzyme in the cats infected with *C. felis* was reduced by 9% compared to the healthy group, which was statistically significant (p=0.004). Moreover, lipid peroxidation level was significantly increased in cats infected with *C. felis* compared to the parasite-free group (p=0.021). The findings of the present study showed that the prevalence of *C. felis* parasite in cats was 3%. A decrease in the level of catalase enzyme and an increase in lipid peroxidation were observed in cats infected with *C. felis* compared to cats free of the parasite.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Blood parasite, Cat, *Cytauxzoon felis*, Lipid Peroxidation, Oxidative stress.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2024.1984795.1413

مقایسه وضعیت استرس اکسیداتیو در گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* (*Cytauxzoon felis*) و گربه‌های سالم

کیمیا ظفری[۱]، سیده‌ام‌البنین قاسمیان[۲*]

۱- دانش‌آموخته، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.
۲- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: ghasemian1249@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۹ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۸/۲۳)

چکیده

سیتاگزئونوزیس (Cytauxzoonosis) یک بیماری عفونی در حال ظهور است که گربه‌سانان وحشی و همچنین گربه‌های اهلی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری توسط انگل‌های تک‌یاخته‌ای *apicomplexan* متعلق به جنس *Cytauxzoon* ایجاد می‌شود. ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌تواند اثرات سوء درگیری با انگل *سیتاگزوون فلیس* (*Cytauxzoon felis*) بر سلامت گربه‌های خانگی را مشخص کند. مطالعه حاضر با هدف تعیین شیوع انگل *C. felis* در گربه‌های شهرکرد و ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گربه‌های آلوده به این انگل و مقایسه آن با گربه‌های سالم صورت گرفت. بدین منظور از ۱۰۰ نمونه خون گربه که به آزمایشگاه دامپزشکی شهرکرد ارجاع شده بود، استفاده گردید. نمونه‌های خون در ۲ لوله جداگانه، جهت بررسی شیوع انگل مذکور، با استفاده از آزمون مولکولی PCR و تعیین میزان برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو (پارامترهای آنتی‌اکسیدانی) شامل فعالیت آنزیم کاتالاز و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی، اخذ و استفاده شد. نتایج حاصله نشان داد که ۳ درصد از گربه‌های مورد بررسی به انگل *C. felis* آلوده بودند. همچنین سطح آنزیم کاتالاز در خون گربه‌های گروه درگیر با انگل مذکور، ۹ درصد نسبت به مقدار آن در خون گربه‌های گروه عاری از انگل کاهش یافته بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۴). اما سطح پراکسیداسیون لیپیدی در خون به طور معنی‌داری در گربه‌های آلوده با انگل *C. felis* بیشتر از گربه‌های عاری از انگل مزبور بود (p=۰/۰۲). یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که شیوع انگل *C. felis* در گربه‌های شهرکرد ۳ درصد است. همچنین، کاهش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گربه‌های مبتلا به این انگل نسبت به گربه‌های عاری از آن مشاهده شد.

کلیدواژه‌ها: انگل خونی، استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، *سیتاگزوون فلیس*، گربه.

مقدمه

سیتاگزئونوزیس (Cytauxzoonosis) یک بیماری کشنده گربه‌های خانگی است که توسط *Cytauxzoon felis*، که یک انگل تک‌یاخته اپی‌کمپلکسا از خانواده تیلریاها است، منتقل می‌شود. در واقع بیماری فوق، به دنبال گزش کنه ستاره‌ای (*Amblyomma americanum*) ایجاد می‌شود. میزبان اصلی این انگل گربه‌های وحشی هستند، با این‌حال، بیماری در گربه‌های اهلی هم دیده شده‌است. این ارگانیسم تک یاخته دارای چرخه حیات پیچیده‌ای است که شامل تولید مثل غیرجنسی در میزبان‌های گربه‌سانان و تولید مثل غیرجنسی و جنسی در ناقل‌های کنه ایکسودیده (Ixodidae)است (Jalovecka *et al*., 2018). انگل مذکور در میانه دهه ۱۹۷۰ کشف شده و گسترش آن رو به افزایش بوده و از نقاط مختلف جهان، گزارش شده‌است (Reichard *et al*., 2021). پس از ورود عامل بیماری به داخل بدن توسط کنه، انگل وارد چرخه تولیدمثلی شده و تعداد زیادی از گلبول‌های سفید را درگیر می‌کند. این گلبول‌ها در رگ‌های خونی کوچک تجمع کرده و منجر به بروز ترومبوز انگلی، عدم خون‌رسانی به بافت‌ها و در نهایت ایسکمی می‌شوند. ممکن است گلبول‌های سفید آلوده پاره شده و باعث آلودگی گلبول‌های قرمز توسط مروزوئیت‌های آزاد شده، گردند. بیماری سیتاگزئونوز کشنده است و در صورت عدم درمان، حیوانات زنده مانده به‌صورت مزمن ناقل باقی خواهند ماند. ناقلین غالبا علائم بیماری بالینی را نشان نمی‌دهند، با این‌حال ممکن است به‌طور کامل ایمن نبوده و از عوارض بی‌علامت بیماری رنج ببرند (Sherrill and Cohn, 2015).

تشخیص سریع بیماری ناشی از *C. felis* توسط بررسی لام خون محیطی به کمک رنگ‌آمیزی‌های رایت گیمسا، گیمسا و یا رومانوسکی صورت می‌گیرد. با این‌حال، تشخیص بیماری به دنبال مشاهده پیروپلاسم‌ها در گسترش خون قابل‌اعتماد نیست چراکه اجسام پیروپلاسمی معمولا ۱ تا ۳ روز قبل از مرگ در خون محیطی حضور می‌یابند و در این حالت نیز تنها در ۱ تا ۴ درصد بیماران، قابلیت مشاهده میکروسکوپیک وجود دارد. پیروپلاسم‌ها هیچ شکل ثابتی ندارند و می‌توانند چند شکلی، گرد، بیضی، دوهسته‌ای و یا کشیده باشند. از این‌رو تشخیص بسیار سخت و گاه غیرممکن می‌شود. به علاوه تفریق اجسام مشاهده شده از *مایکوپلاسما هموفلیس* (*Mycoplasma haemofelis*)، اجسام هاول-جولی، رسوب رنگ و آرتیفکت‌های دیگر الزامی است. امروزه آزمون‌های ردیابی مولکولی نظیر PCR با ارائه اختصاصیت و حساسیت بسیار بالاتر نسبت به روش‌های میکروسکوپیک، توانسته‌اند تشخیص قطعی بیماری سیتاگزئونوزیس را ممکن سازند. آزمون‌های ردیابی ژنتیکی روشی مناسب در تشخیص این بیماری است و انجام آن در تمامی گربه‌های مشکوک حتی در مواردی که در گسترش خون هیچ جسم پیروپلاسمایی مشاهده نشده است، توصیه می‌شود (Irwin, 2012).

علاوه بر این، روش PCR، به ویژه همراه با توالی‌یابی DNA، می‌تواند گونه‌های Cytauxzoon را متمایز کند، ازجمله *Theileria spp*. و *Babesia spp*. را که حتی از نظر مورفولوژیکی قابل تشخیص نیستند. معایب PCR شامل ناتوانی در افتراق بیماری حاد از عفونت مزمن *C. felis* بوده و نیاز به یک بازه زمانی چند

ساعته برای عملکرد در محل یا چند روز برای نمونه‌هایی است که از راه دور به یک آزمایشگاه تشخیصی ارسال می‌شوند. این تاخیر در تشخیص بسیار مهم است، زیرا دامپزشکان نمی‌توانند این ساعات حیاتی را در مرحله حاد بیماری از دست بدهند (Wang *et al.*, 2017). ژن‌های مورد استفاده برای بررسی انگل *C. felis* در گربه‌ها معمولاً ژن 18S rRNA و دو ژن میتوکندری، سیتوکروم b و سیتوکروم c اکسیداز هستند، که این ژن‌ها بیشتر برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک گونه‌های *Cytauxzoon* مورد استفاده قرار می‌گیرند. ناحیه داخلی رونویسی‌شده ۲ (Internal transcribed spacer 2, ITS2) ریبوزومی هسته‌ای اغلب به عنوان نشانگر مولکولی در مطالعات فیلوژنتیک و شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود. این ناحیه دارای تعدادی ویژگی ارزشمند مانند در دسترس‌بودن مناطق حفاظت‌شده برای طراحی پرایمرهای جهانی، سهولت تقویت آن و تنوع کافی برای تشخیص حتی گونه‌های نزدیک به هم می‌باشد. بنابراین، در زمینه بررسی انگل *C. felis*، منطقه ITS2 به‌طور بالقوه می‌تواند برای تشخیص این انگل، مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف آن مورد استفاده قرار گیرد (Wang *et al.*, 2017).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با حذف رادیکال‌های آزاد یا جذب آن‌ها از اثرات مضر آن‌ها ممانعت می‌کنند. میزان پرواکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان شاخص تخریب رادیکال‌ها شناخته شده است. تبدیل اسیدهای چرب به رادیکال آزاد به‌صورت زنجیروار صورت می‌گیرد و می‌تواند باعث آسیب به غشاها و عوارضی نظیر همولیز، آثار موتاژنیک و کاریوژنیک شود (Negre-Salvayre *et al.*, 2010). بنابراین ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی (Lipid peroxidation) حائز اهمیت فراوان است. همچنین، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز سطح استرس اکسیداتیو و سطح آنتی‌اکسیدانی را در بدن مشخص می‌کند (Aslahnezhad *et al.*, 2022; Karimi Dehkordi and Ghasemian, 2022; Kiani Monfared *et al.*, 2018). هرچه سطح آنزیم کاتالاز (Catalase) بالاتر باشد، میزان رادیکال‌های آزاد کمتر خواهد بود (Yin *et al.*, 2011).

این دو شاخص از مهم‌ترین معیارهای سنجش تعادل اکسیداسیون و آنتی‌اکسیدانی است، از این رو می‌تواند وضعیت استرس و تنش ناشی از بیماری سیتاگزئونوزیس را به خوبی به نمایش بگذارد. لذا هدف از اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو، بررسی اثرات سوء درگیری با انگل *C. felis* بر سلامت بدن است.

از آن‌جایی که بیشتر گربه‌سانان ایرانی در معرض خطر انقراض هستند، شناسایی عفونت *C. felis* حائز اهمیت فراوان است و با توجه به کمبود اطلاعات در خصوص ویژگی‌های شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گربه‌های مبتلا به *C. felis*، مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع انگل *C. felis* در گربه‌های شهرکرد و ارزیابی دو شاخص استرس اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم کاتالاز) در گربه‌های آلوده به این انگل و مقایسه آن در گربه‌های سالم صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی است که روی نمونه خون گربه‌های مراجعه‌کننده به آزمایشگاه دامپزشکی شهرکرد در طی اردیبهشت ۱۴۰۱ تا خرداد

۱۴۰۲ انجام گردید. با توجه به میزان مراجعات روزانه به آزمایشگاه دامپزشکی شهرکرد و همچنین تعداد تخمینی تعداد گربه‌های در دسترس در بازه زمانی مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد.

ابتدا نمونه‌های خون در ۲ ویال جداگانه، جهت بررسی مولکولی شیوع انگل *C. felis* و تعیین میزان پارامترهای آنتی‌اکسیدانی خون، اخذ شد. بدین منظور خون‌های اخذ شده، هر یک جداگانه در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ریخته می‌شد و سپس جهت بررسی مولکولی و تعیین میزان پارامترهای آنتی‌اکسیدانی به ۲ قسمت، تقسیم می‌گردید، به‌طوری که یک قسمت از هر نمونه خون اخذ شده، جهت انجام PCR در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس قرار می‌گرفت و قسمت دوم آن سانتریفیوژ (مدل EBA200 برند ELMINO، اسپانیا) (۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) شده و سرم حاصله جهت سنجش سطح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانتی در دمای منفی ۲۰ درجه تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری می‌گردید.

- روش مولکولی استفاده شده به منظور شناسایی انگل *سیتاگزوون فلیس*

- استخراج DNA از ژنوم انگل *سیتاگزوون فلیس*: استخراج DNA با استفاده از کیت های جداسازی DNA (DENAzist، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به این منظور از نمونه‌های مورد نظر، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه خون، درون یک میکروتویوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس به‌ترتیب، ۲۰۰ میکرولیتر بافر FATG1 (Festuca arundinacea Taxonomic Grouping-1)، ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۲۰۰ میکرولیتر بافر FATG2، به آن اضافه شده و انکوبه گردید. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول (۹۶ درجه) به مخلوط اضافه شد و پس از انجام عمل ورتکس، سانتریفیوژ گردید. سپس، ۴۰۰ میکرولیتر از بافر W1 و ۷۵۰ میکرولیتر بافر شستشو به رسوب حاصله در مرحله قبل اضافه شده و در بالاترین دور به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت جهت خشک شدن رسوب مربوط به مرحله استخراج DNA، مرحله سانتریفیوژ با بالاترین سرعت به مدت ۳ دقیقه تکرار شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از Elution بافر نگه‌داری شده در دمای ۷۰ درجه به رسوب استخراج شده اضافه گردیده و به مدت ۳ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس در بالاترین دور به مدت ۲ دقیقه دیگر سانتریفیوژ شد تا DNA استخراج شده شسته شود.

- طراحی، ساخت و آماده‌سازی پرایمرهای لازم: با توجه به روش براون و همکاران (Brown *et al.*, 2008)، ژن فضای رونویسی داخلی ۲ (ITS2) در انگل *C. felis* به اضافه ۸/۵S و ۲۸S مناطق جانبی جزئی آن جهت شناسایی این انگل در نظر گرفته شد. به همین منظور یک جفت پرایمر جهت تایید انگل *C. felis* استفاده شد. پرایمرها با توالی فوروارد (5-TGA ACG TAT TAG ACA CAC CAC CT-3) و ریورس (5-TCC TCC CGC TTC ACT CG CCG-3) طراحی گردید و توسط شرکت پیشگام ساخته شد. پرایمرها به‌صورت لیوفیلیزه تحویل گرفته شده و تا زمان استفاده، در یخچال آزمایشگاهی، نگهداری شدند. در ادامه به میکروتیوب‌های حاوی هر پرایمر، به میزان ذکر شده در دستورالعمل رقت‌سازی شرکت سازنده، آب مقطر

استریل بدون یون اضافه گردید. سپس با استفاده از غلظت اولیه ۱۰۰ پیکومول و پس از رقت‌سازی (افزودن ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل)، جداگانه، غلظت ۱۰ پیکومول از هر پرایمر تهیه شد.

- مواد استفاده شده و روش PCR انجام گرفته بر روی نمونه‌ها: تکثیر در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی الگوی DNA (۱ میکرولیتر)، پرایمر (۱ میکرولیتر)، و مخلوط اصلی PCR (Amplicon، دانمارک) با استفاده از ترموسایکلر Bio-Rad تحت برنامه زیر انجام شد: مرحله دناتوراسیون (۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس)، ۳۴ چرخه amplification (مرحله دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله annealing، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس، مرحله گسترش، ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس)، و گسترش نهایی، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. محصولات PCR (۱۰ میکرولیتر) از طریق یک ژل آگارز ۱ درصد با بافر (۱۰X) TBE الکتروفورز شده و توسط اتیدیوم بروماید و ترانس روشن کننده UV قابل مشاهده است. اندازه محصول مورد انتظار PCR تقریباً ۴۳۱ جفت باز از DNA ژنومی *C. felis* بود که ناحیه ۲۶۵ جفت باز ITS2 را در خود جای داده است. آب مقطر و DNA جدا شده از یک گربه سالم بالینی بدون سابقه آلودگی به کنه در واکنش PCR به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ژنوم *C. felis* که قبلا از یک گربه وحشی استخراج شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. تمامی کارهای مولکولی در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه شهرکرد صورت گرفت.

- سنجش سطح آنزیم کاتالاز: فعالیت کاتالاز با استفاده از روش Beer و Sizer تخمین زده شد (Krishna *et al.*, 2021). بدین منظور از محلول پراکسیدهیدروژن به عنوان سوبسترا استفاده شد و کاهش فعالیت آنزیم مذکور در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در مخلوط واکنش، شامل ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کاتالاز سرمی، ۲۰ میکرولیتر سوبسترا، ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ mM (با pH=۷) و ۳۰ میلی مول محلول پراکسیدهیدروژن ذکر شده، در طول موج ۲۴۰ نانومتر، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، اندازه‌گیری شده و نتایج برحسب واحد برگرم هموگلوبین، ثبت گردید. لازم به ذکر است که غلظت هموگلوبین به وسیله روش سیان‌مت هموگلوبین (Cyanmethemoglobin) تعیین شد. در این روش از شمارشگر سلولی counlter-T-860 استفاده گردید. به این منظور ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون با ۵۰۰ میکرولیتر محلول درابکین مخلوط گردید. بعد از ۳ تا ۵ دقیقه انکوبه‌کردن در دمای محیط، سلول‌های قرمز لیز شده و هموگلوبین آزاد شده به وسیله محلول لیز به سیان‌مت‌هموگلوبین تبدیل می‌شود. در نهایت جذب نوری کمپلکس ایجاد شده توسط دستگاه فتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانش شد.

- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی: جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لپیدی از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد که در طی آن مقدار محصولات واکنشی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) اندازه‌گیری می‌شود. بدین منظور در ابتدا، ۱ میلی‌لیتر پلاسما، ۱ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیک و ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۵ درصد با هم مخلوط شده و در دور ۲۰۰۰rpm برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصله با ۰/۲۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید مخلوط گردیده و در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، به

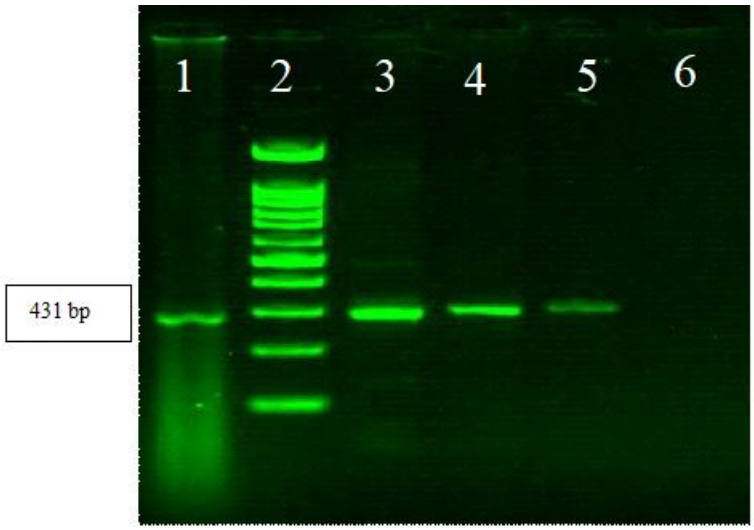
مدت یک ساعت گرمادهی شد. پس از سرد شدن مخلوط مذکور، شدت تولید رنگ صورتی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد و در نهایت غلظت MDA برطبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$1\mu mol/1MDA = \frac{OD\ 532 \times 1.75}{0.156}$$

- **تحلیل آماری داده‌ها**: پردازش داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای Excel و SPSS صورت گرفت. جهت تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون Oneway ANOVA استفاده شد. همچنین جهت تعیین سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته‌شد.

یافته‌ها

براساس نتایج کارهای مولکولی انجام گرفته در تحقیق حاضر، مشخص گردید که در گربه‌های مورد آزمایش، ۳ درصد (۳ مورد) آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* بودند و ۹۷ گربه (۹۷ درصد) دیگر از نظر این انگل *سیتاگزوون فلیس* سالم بودند. شکل ۱ تصویر ژل الکتروفورز شده محصول واکنش PCR برای ژن فضای رونویسی داخلی ۲، برای سه مورد مثبت مربوط به انگل *سیتاگزوون فلیس* در نمونه‌های خون آزمایش‌شده را نمایش می‌دهد. در شکل ۱ مشاهده باند ۴۳۱ نوکلئوتیدی در ستون اول، سوم و چهارم به ترتیب مربوط به نمونه‌های مثبت ۱، ۲ و ۳ نشان‌دهنده آلوده‌بودن این نمونه‌ها به انگل *سیتاگزوون فلیس* می‌باشد. ستون ۵ مربوط به نمونه کنترل مثبت و ستون ششم کنترل منفی می‌باشد. همچنین در ۹۷ درصد گربه سالم باندی برای ژن فضای رونویسی داخلی ۲ بر روی ژل مشاهده نشد.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز شده محصول ۴۳۱ نوکلئوتیدی PCR از موارد مثبت حضور انگل *سیتاگزوون فلیس*؛ از چپ به راست، ستون اول نمونه مثبت شماره ۱، ستون دوم سایز مارکر (دنازیست، ایران) ۵۰۰bp، ستون سوم و چهارم نمونه‌های مثبت ۲ و ۳، ستون پنجم کنترل مثبت و ستون ششم کنترل منفی را نشان می‌دهد.

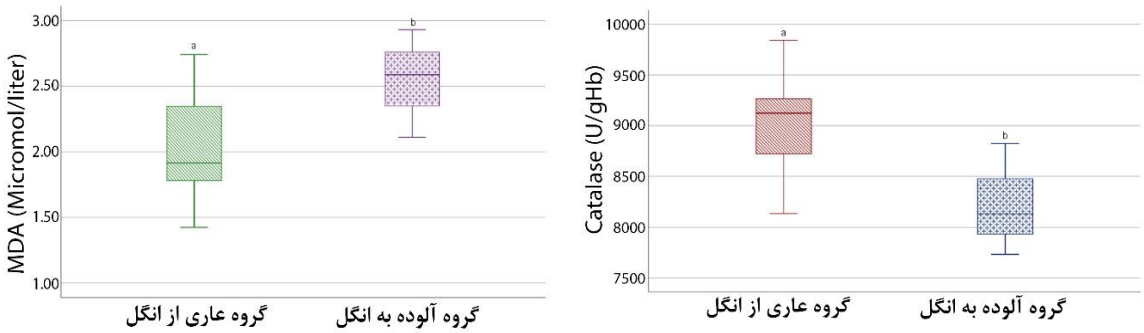
از طرف دیگر میانگین مقدار آنزیم کاتالاز در سرم گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* و گربه‌های عاری از انگل مذکور، به ترتیب ۸۲۲۹/۱ (دامنه ۷۷۳۲/۵ تا ۸۸۲۳/۲) و ۹۰۴۳/۲ (دامنه ۸۱۳۳/۳ تا ۹۸۴۳/۷) واحد بین‌الملل بر گرم هموگلوبین بود که مقایسه نتایج حاصله در مورد ۲ گروه مذکور هم حاکی از آن است که سطح آنزیم کاتالاز در گربه‌های درگیر با انگل *سیتاگزوون فلیس* ۹ درصد نسبت به گروه عاری از انگل کاهش یافته و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۰۴).

همچنین میانگین میزان پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در سرم گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* ۲/۵۴ (دامنه ۲/۱۱ تا ۲/۹۳) و در سرم گربه‌های عاری از انگل مذکور، ۲/۰۵ (دامنه ۱/۴۲ تا ۲/۷۴) میکرومول بر لیتر بود. تحلیل آماری داده‌های مذکور هم مشخص کرد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سرم گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* ۱۹/۳ درصد نسبت به مقدار آن در سرم گربه‌های عاری از انگل مذکور، افزایش داشت که اختلاف مشاهده شده هم به لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۲۱).

مقایسه میانگین مقادیر آنزیم کاتالاز و مالون‌دی‌آلدئید در سرم گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* در مقایسه با سرم گربه‌های گروه عاری از انگل مذکور هم در جدول ۱ ارائه شده‌است. همچنین نمودار ۱ نیز پراکندگی داده‌های مربوط به مقدار آنزیم کاتالاز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی را نمایش می‌دهد. پانل A ارتباط بین مقدار آنزیم کاتالاز در گربه‌های سالم با گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی ۰/۱۴ است. پانل B ارتباط بین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گربه‌های سالم با گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی ۰/۳۸ است. همه این همبستگی‌ها معنی دار بوده است (p<۰/۰۵).

جدول ۱- میانگین مقادیر آنزیم کاتالاز و مالون‌دی‌آلدئید در سرم گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* و عاری از انگل مذکور

نمونه آزمایش‌شده	نمونه خون گربه‌های آلوده		نمونه خون گربه‌های غیرآلوده		*p*-value
فاکتور بررسی‌شده	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
مقدار سرمی آنزیم کاتالاز (U/gHb)	۸۲۲۹/۱a	۵۵۱/۹	۹۰۴۳/۲b	۴۷۴/۷	۰/۰۰۴
مقدار سرمی مالون‌دی‌آلدئید (µmol/l)	۲/۵۴a	۰/۴۱	۲/۰۵b	۰/۳۶	۰/۰۲



نمودار ۱- پراکندگی داده‌های مربوط به مقدار آنزیم کاتالاز (A) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی (B)؛ بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر هر گروه توسط خطوط بالا و پایین مستطیل‌ها قابل‌مشاهده است. دامنه تغییرات بین چارک اول و آخر داده‌ها درون مستطیل، حاکی از آن است که نیمی از داده‌ها داخل مستطیل قرار دارند. میانه توسط خط تیره رنگ داخل مستطیل قابل‌مشاهده است. گروه‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند اختلاف آماری معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی بیان ژن مربوط به ژن فضای رونویسی داخلی ۲ در گربه‌ها نشان داد که شیوع انگل *سیتاگزوون فلیس* در گربه‌های شهرکرد ۳ درصد است. نتایج به دست آمده از بررسی سطح آنزیم کاتالاز نشان داد که در گربه‌های آلوده به انگل *سیتاگزوون فلیس* ۹ درصد نسبت به گروه سالم کاهش یافته است. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه آلوده با انگل سیتاگزوون ۱۹/۳ درصد نسبت به گروه عاری از انگل افزایش یافته است.

منشأ *C. felis* منطقه آمریکای‌شمالی است، با این حال، گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی به این انگل از دیگر نقاط جهان اعم از آسیا دریافت شده است. اولین مورد ابتلا به این انگل در آسیا (هند) توسط وارشنی و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش شد (Varshney *et al*., 2009). تا کنون، تنها سه مورد از ابتلا به این انگل در گربه‌های وحشی در ایران گزارش شده است و پژوهش‌های اپیدمیولوژیکی محدودی در راستای بررسی شیوع میکروسکوپی یا مولکولی انگل *C. felis* در گربه‌های بدون صاحب و خانگی در ایران، صورت گرفته است. اولین مورد گزارش *C. felis* در گربه‌های ایرانی در منطقه حفاظت شده استان تهران بود (Rassouli *et al*., 2015). دومین مورد در استان خراسان توسط ضعیمی و همکاران گزارش شد. تجزیه و تحلیل خون شناسی با *C. felis* سازگار بود. کم خونی نورموکرومیک خفیف، نوتروفیلی، ائوزینوپنی، لنفوپنی از علائم قابل مشاهده بودند. علاوه بر این، تغییرات بیوشیمیایی شامل افزایش فعالیت آنزیم کبدی سرم و افزایش غلظت سرمی کلسترول، بیلی روبین، گلوکز، پروتئین و فیبرینوژن مشاهده شد. بررسی‌های خون شناسی و بیوشیمیایی و مولکولی که با هدف تایید نتایج میکروسکوپی انجام شد وجود این گونه انگلی را تایید نمود (Zaeemi *et al*., 2015). سومین مطالعه توسط مقدم و همکاران در سال ۲۰۲۰ روی ۱۰۰ نمونه خون گربه‌های علامت‌دار و بی علامت خیابانی در مشهد اخذ گردید. میزان شیوع در روش تشخیصی میکروسکوپیک و مولکولی به ترتیب ۵ و ۱۹ درصد بود. ارتباطی بین میزان شیوع و سن و جنسیت مشاهده نشد. تنها در ۱۶ درصد از موارد تشخیص ژنتیکی همراه با علائم بالینی بود و ۸۴ درصد موارد مثبت، ناقل بی‌علامت بودند (Rahmati Moghaddam *et al*., 2020). در مطالعه‌ای که توسط کاراکا و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه جهت بررسی آلودگی به انگل *سیتاگزوون فلیس* انجام شد، تعداد ۱۲۰ قلاده گربه با استفاده از روش میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. یافته‌ها حاکی از آن بود که ۷/۵ درصد از گربه‌ها این انگل را در خون خود داشتند. در پیگیری ۱ تا ۷ ساله، نشانه‌های بالینی مرتبط با عفونت یافت نشد که احتمالا به دلیل ایمنی از پیش موجود علیه عوامل انگلی است (Karaca *et al*., 2007). این میزان در مقایسه با مطالعه ارائه شده در ایران کمی بیشتر است. همچنین، به این دلیل که در مطالعه مذکور تنها از شیوه میکروسکوپی به منظور شناسایی *C. felis* استفاده شده، نمی‌توان به نتایج این پژوهش‌ها به صورت قطعی اطمینان نمود. به نظر می‌رسد که بررسی میکروسکوپی ویژگی و حساسیت پایینی در شناسایی این انگل دارد.

در بخش وسیعی از پژوهش‌هایی که اخیرا صورت گرفته است، شناسایی این نوع آلودگی انگلی به وسیله

شیوه‌های مولکولی و بررسی توالی 18S rRNA و یا ITS انجام شده است. در اکثر پژوهش‌های مولکولی انجام شده در اروپا و امریکا که در آنها شمار زیادی نمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند، شیوع *C. felis* کمتر از ۵ درصد گزارش شده است (Mylonakis *et al*., 2018; Nagamori *et al*., 2016; Carli *et al*., 2012; Spada *et al*., 2014). مطالعه هابر و همکاران درسال ۲۰۰۷ که بر روی گروه بزرگی از گربه‌ها با روش PCR انجام شده، شیوع *C. felis* را ۰/۳ درصد گزارش کرده‌است (Haber *et al*., 2007). مطالعه کارلی و همکاران که از روش‌های میکروسکوپی و PCR با بررسی توالی ژن 18s rRNA جهت شناسایی *C. felis* استفاده کرده‌اند، نشان داده که عفونت با انگل مذکور، به طور معنی‌داری با آزاد بودن حیوان وابسته است. همچنین نامبردگان هیچ رابطه معنی‌داری بین موارد مثبت *C. felis* با نژاد، جنس، سن، وجود کنه و کک، آنمی و مرگ و میر گزارش نکردند (Carli *et al*., 2012). مطالعه شاک و همکاران توزیع و شیوع انگل سیتاگزوون در گربه‌های دم کوتاه ۱۳ ایالت آمریکا را تحت بررسی قراردادند.

ایالت‌های مذکور به علت حضور وکتورهای متفاوت انتخاب شدند و برای شناسایی این انگل از روش PCR استفاده گردید و ژن ITS2 ردیابی شد. میزان شیوع در ایالاتی که جمعیتی پابرجا از *Amblyomma americanum* داشتند بالاتر بود، که از داده‌های اخیر در رابطه با انتقال تجربی *C. felis* به‌وسیله *A. americanum* حمایت می‌کند. بنابراین، گربه‌های وحشی یک مخزن اصلی برای *C. felis* می‌باشند (Shock *et al*., 2011). دیگر یافته‌ها نشان داده‌اند که عفونت سیتاگزوون در نمونه‌های بدست آمده در ماه‌های سرد و نمونه‌هایی که از نواحی روستایی بدست آمده بود، شایع‌تر است (Díaz-Regañón *et al*., 2017). با این حال، شیوع سیتوگزئونوزیس در یک ناحیه انزئوتیک خاص می‌تواند برحسب زمان، مکان و جمعیت گربه‌های نمونه برداری شده دارای تفاوت باشد (Rizzi *et al*., 2015). از آنجا که گربه‌ها به وسیله گزش کنه‌ها به *C. felis* آلوده می‌شوند، شیوع عفونت این انگل در گربه‌های خانگی ممکن است تحت تاثیر تنوع جغرافیایی، میزان فعالیت کنه‌ها و میزبان‌های مخزن باشد (Mylonakis *et al*., 2018).

یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از کاهش سطح آنزیم کاتالاز و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گربه‌های آلوده به انگل *C. felis* نسبت به گربه‌های عاری از انگل مذکور بود. تاکنون، میزان شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در گربه‌ها در ایران سنجیده نشده است. به‌علاوه تاکنون، هیچ پژوهشی سطح این آنزیم‌ها را در گربه‌های مبتلا به *C. felis* و گربه‌های سالم مقایسه نکرده‌است. لذا، مطالعه مشابهی جهت تایید یا رد یافته‌های این مطالعه موجود نیست.

اپی‌توپ‌های MDA پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحریک می‌کنند چرا که جزو فاکتورهای پیش‌التهابی هستند و بنابراین اهداف مهم پاسخ‌های سیستم ایمنی بدن هستند (Papac-Milicevic *et al*., 2016). مطالعه‌ای که به بررسی پاسخ‌های ایمنی سیستمیک در گربه‌های آلوده به *C. felis* انجام شده نشان داد که پاسخ‌های ایمونوپاتولوژیک در گربه‌هایی که در اثر عفونت تلف شده‌بودند، به‌مراتب بیشتر از گربه‌هایی بود که از آن جان سالم به‌در بردند (Frontera-Acevedo *et al*., 2013). همچنین برخی یافته‌ها نشان داده‌اند که یافته‌های هیستوپاتولوژیک در

ریه‌های گربه‌های آلوده به *C. felis* ناشی از آزادسازی واسطه‌های التهابی مانند سیتوکین‌ها و افزایش تولید نیتریک‌اکسید سنتتاز (iNOS) توسط ماکروفاژهای آلوده است. یک تنظیم مثبت در مولکول چسبندگی CD_{18} می‌تواند آزادسازی این واسطه‌های پیش‌التهابی را تحریک کند. همچنین گزارش شده که در گربه‌های بیمار، بیان فاکتور نکروز تومور-α (TNF-α)، اینترلوکین β، IL-6، iNOS و مجتمع اصلی سازگاری بافتی II (MHC) در مقایسه با ریه‌های گربه‌های سالم و غیرعفونی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، MHC(II) در اندوتلیوم گربه‌هایی که به طور طبیعی با *C. felis* آلوده شده بودند بیان شده است. این نتایج نشان می‌دهد که یک پاسخ ایمنی مشخص موضعی و پیش‌التهابی وجود دارد که می‌تواند به شناخت پاتوژنز *C. felis* در ریه‌ها کمک کند (Hakimitabar, 2019). همچنین برخی یافته‌ها نشان داده‌است که سطح پراکسیداسیون لیپیدی در گربه‌های نر بیشتر از گربه‌های ماده و سطح آنزیم کاتالاز در نرها پایین‌تر از ماده‌ها است. به‌علاوه، سطح این آنزیم‌ها ارتباط معنی‌داری با وضعیت سلامت حیوان دارد (Todorova *et al*., 2005).

یافته‌های حاصله از مطالعه حاضر نشان داد که شیوع انگل *C. felis* در گربه‌های شهرکرد ۳ درصد است و با توجه به این‌که حضور گربه‌های ولگرد در چرخه زندگی انگل *C. felis* نقش مهمی دارند، لذا یافته مذکور می‌تواند از نظر توجیه میزان شیوع عفونت با انگل مذکور، مهم تلقی شود. از طرف دیگر مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به بررسی سطح آنزیم‌های کاتالاز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گربه‌ها در ایران پرداخته است. همچنین در هیچ مطالعه‌ای سطح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در گربه‌های سالم و مبتلا به *C. felis* مقایسه نشده‌است. از این رو به نظر می‌رسد که پژوه حاضر از لحاظ تعیین سطح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در گربه‌های مبتلا به *C. felis* در ایران و مقایسه سطح این شاخص‌ها با گربه‌های سالم دارای جنبه‌های نوآورانه است. البته مهمترین محدودیت مطالعه، تک مرکزی بودن آن و محدود شدن آن به یک استان بود. همچنین حجم کم نمونه و عدم ارزیابی سایر فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد. انجام مطالعاتی جهت بررسی فراوانی آلودگی به *C. felis* در کنه‌های موجود در ایران و تشخیص گونه‌های ناقل این تک یاخته، ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

اطلاعات ارائه شده در مقاله حاضر، از نتایج رساله کارشناسی ارشد خانم کیمیا ظفری (کد رساله: ۱۶۲۵۱۹۶۲۲) استخراج شده است. همچنین بدین وسیله نویسندگان از تمام کسانی که ما را در انجام کارهای پژوهشی پایان‌نامه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

- Aslahnezhad, Z., Eidi, A., Mortazavi, P. and Oryan, S. (2022). Effect of magnesium sulfate on letrozole-induced oxidative stress in ovarian tissue of adult female Wistar rats. Veterinary Clinical Pathology, 16(61): 1-14.
- Brown, H.M., Latimer, K.S., Erikson, L.E., Cashwell, M.E., Britt, J.O. and Peterson, D.S. (2008). Detection of persistent cytauxzoon felis infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20(4): 485-488.
- Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., *et al*. (2012). Cytauxzoon sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. Veterinary Parasitology, 183(3-4): 343-352.
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-Bueno, L., *et al*. (2017). Molecular detection of Hepatozoon spp. and Cytauxzoon sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. Parasites and Vectors, 10(1): 1-9.
- Frontera-Acevedo, K., Balsone, N.M ,.Dugan, M.A., Makemson, C.R., Sellers, L.B., Brown, H.M., *et al*. (2013). Systemic immune responses in Cytauxzoon felis-infected domestic cats. American Journal of Veterinary Research, 74(6): 901-909.
- Haber, M.D., Tucker, M.D., Marr, H.S., Levy, J.K., Burgess, J., Lappin, M.R., *et al*. (2007). The detection of Cytauxzoon felis in apparently healthy free-roaming cats in the USA. Veterinary Parasitology, 146(3-4): 316-32.
- Irwin, P. (2012). Babesiosis and cytauxzoonosis. In BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. BSAVA Library. pp: 74-80.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P. and Malandrin, L. (2018). The complexity of piroplasms life cycles. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8: 248.
- Karaca, M., Akkan, H.A., Tutuncu, M., Ozdal, N., Deger, S. and Agaoglu, Z. (2007). Cytauxzoonosis in Van cats. Van Veterinary Journal, 18(1): 37-39.
- Karimi Dehkordi, M. and Ghasemian, S.O. (2022). Assessment of oxidative stress indexes and BCS in clinical mastitis cows in comparison with healthy cows. Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal, 16(61): 29-42.
- Kiani Monfared, K., Mohammadi, G.R., Taghavi Razavizadeh, S.A. and Heidarpour, M. (2018). The status of oxidative stress and some trace elements, hematological and serum biochemical indices in dairy cows with left displacement of the abomasum. Veterinary Clinical Pathology, 12(4): 379-391.
- Kozan, E., Avcı, G., Sevimli, F.K., Birdane, F.M. and Köse, M. (2010). Determine of the antioxidant levels and some biochemical parameters on infected with ascaridiosis and treated dogs. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 57(2): 93-97.
- Krishna, H., Avinash, K., Shivakumar, A., AL-Tayar, N.G.S. and Shrestha, A.K. (2021). x Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 251: 119358.
- Mylonakis, M. E., Schreeg, M., Chatzis, M.K., Pearce, J., Marr, H.S., Saridomichelakis, M.N., *et al*. (2018). Molecular detection of vector-borne pathogens in Greek cats. Ticks and Tick-Borne Diseases, 9(2): 171-175.
- Nagamori, Y., Slovak, J.E. and Reichard, M.V. (2016). Prevalence of Cytauxzoon felis infection in healthy free-roaming cats in north-central Oklahoma and central Iowa. Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, 2(1): 1-4.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., *et al*. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. Free Radical Research, 44(10): 1125-1171.
- Papac-Milicevic, N., Busch, C.J. and Binder, C.J. (2016). Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. Advances in Immunology, 131: 1-59.
- Rahmati Moghaddam, M., Zaeemi, M. and Razmi, G.R. (2020). Preliminary study of Cytauxzoon felis infection in outdoor cats in Mashhad, Iran. Parasitology Research, 119(12): 4177-4183.

- Rassouli, M., Sabouri, S., Goudarzi, A. and Parsa, M. (2015). Cytauxzoon felis in a stray cat in Iran. Comparative Clinical Pathology, 24(1): 75-77.
- Reichard, M.V., Sanders, T.L., Weerarathne, P., Meinkoth, J.H., Miller, C.A., Scimeca, R.C., *et al*. (2021). Cytauxzoonosis in North America. Pathogens, 10(9): 1170.
- Rizzi, T.E., Reichard, M.V., Cohn, L.A., Birkenheuer, A.J., Taylor, J.D. and Meinkoth, J.H. (2015). Prevalence of Cytauxzoon felis infection in healthy cats from enzootic areas in Arkansas, Missouri, and Oklahoma. Parasites and Vectors, 8(1): 1-6.
- Sherrill, M.K. and Cohn, L.A. (2015). Cytauxzoonosis: diagnosis and treatment of an emerging disease. Journal of Feline Medicine and Surgery, 17(11): 940-948.
- Shock, B.C., Murphy, S.M., Patton, L.L., Shock, P.M., Olfenbuttel, C., Beringer, J., *et al*. (2011). Distribution and prevalence of Cytauxzoon felis in bobcats (Lynx rufus), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. Veterinary Parasitology, 175(3-4): 325-330.
- Spada, E., Proverbio, D., Galluzzo, P., Perego, R., Bagnagatti De Giorgi, G., Roggero, N., *et al*. (2014). Frequency of piroplasms Babesia microti and Cytauxzoon felis in stray cats from northern Italy. BioMed Research International, 2014: 1-5.
- Todorova, I., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D. and Gadjeva, V. (2005). Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. Comparative Clinical Pathology, 13(4): 190-194.
- Varshney, J., Deshmukh, V. and Chaudhary, P. (2009). Fatal cytauxzoonosis in a kitten. Intas Polivet, 10(2): 392-393.
- Wang, J. Li., Ting., L, Guo-Huo., ZHU, X.-Q. and YAO, C. (2017). Two Tales of Cytauxzoon felis Infections in Domestic Cats. Clinical Microbiology Reviews, 30: 861-885.
- Yin, H., Xu, L. and Porter, N.A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chemical Reviews, 111(10): 5944-5972.
- Zaeemi, M., Razmi, G.R. and Khoshnegah, J. (2015). The first detection of Cytauxzoon felis in a wild cat (Felis silvestris) in Iran. Comparative Clinical Pathology, 24(1): 181-184.