DOI: 10.22055/IVJ.2020.190542.2175
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.7.0

بررسی شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی در سگ‌های شهرستان سمنان با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم

بهاره فلاح‌علمداری[۱]، عماد چنگیزی[۲*] و مهدی محبعلی[۳]

[۱] دانش‌آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۲] دانشیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۳] استاد گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۶/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

چکیده

شکل مدیترانه‌ای لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) از خطرناک‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام می‌باشد که در اغلب مناطق ایران به صورت تک‌گیر و در بعضی از استان‌های کشور به صورت بومی دیده می‌شود. سگ اهلی (*Canis familiaris*) مخزن اصلی بیماری در لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه‌ای است. هدف از مطالعه حاضر مشخص نمودن شیوع سرمی (Seroprevalence) حضور بیماری لیشمانیوز احشائی در سگ‌های صاحب‌دار مناطق شهری و روستایی سمنان می‌باشد. به این منظور از ۱۴۰ قلاده سگ صاحب‌دار فاقد علائم بالینی به روش تصادفی خون‌گیری انجام گرفت. تمامی نمونه‌های خون از لحاظ حضور آنتی‌بادی ضد لیشانیایی با عیار ۱:۸۰ و به بالا با آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) مورد آزمایش قرار گرفتند. عیار ۱:۳۲۰ و به بالا به همراه علائم بالینی به عنوان بیمار و عیار ۱:۸۰ و به بالا، بدون علائم بالینی به عنوان عفونت ناشی از *لیشمانیا اینفانتوم* در نظر گرفته شد. از نمونه‌های مرضی شامل طحال، کبد و غدد لنفاوی یک سگ مبتلا با عیار ۱:۲۰۴۸۰ در آزمایشگاه به روش داب، گسترش تهیه شد و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید. در مطالعه میکروسکوپی، اجسام آماستیگوت دیده شد. آنتی‌بادی ضد لیشمانیا در چهار سگ (۲/۹ درصد) با عیار بالاتر از ۱:۳۲۰ در ۱۴۰ سگ مشاهده گردید. از لحاظ شیوع سرمی، اختلاف معنی‌داری میان ابتلا به بیماری با جنسیت و سن دیده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که لیشمانیوز احشایی با میزان شیوع پائین در سگ‌های شهرستان سمنان در حال بروز است.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز احشایی، آزمایش اگلوتیناسیون مستقیم، سگ، سمنان

مقدمه

لیشمانیازیس احشایی توسط گونه‌های مختلفی از جنس لیشمانیا ایجاد می‌گردد. در ایران و منطقه مدیترانه عامل بیماری، *لیشمانیا اینفانتوم* می‌باشد (Mohebali et al. 2005). این بیماری به صورت تک‌گیر و بومی در ایران دیده می‌شود. عفونت‌های انسانی در مناطق بومی محدود به کودکان می‌باشد ولی در مناطقی که بیماری به صورت تک‌گیر مشاهده می‌گردد، در بالغین نیز بیماری دیده خواهد شد (Mohebali et al. 2005). انسان یک میزبان تصادفی

*نویسنده مسئول : عماد چنگیزی، دانشیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
E-mail: echangizi@semnan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

به شمار می‌رود و بیماری به صورت طبیعی در سگ‌ها دیده می‌شود. انتقال بیماری از سگ به انسان توسط گزش پشه فلبوتوموس صورت می‌گیرد (Mohebali et al. 2005; Shaw and Day 2005). اولین بار نیکول و کومت، لیشمانیوز احشایی را در تهران از سگی گزارش نمودند و از آن زمان تا کنون، گزارش‌های متعددی از ابتلا سگ به این بیماری در مناطق مختلف کشور به خصوص نواحی شمال غرب و جنوب استان فارس گزارش شده است (Mohebali et al. 2005; Mohebali et al. 2018).

تایید تشخیص ابتلا حیوان به لیشمانیا، به ویژه هنگامی که علائم بیماری چندان اختصاصی نباشد، بسیار مشکل است. افزون بر این‌ها مطالعات گسترده نشان داده است که ارزش نسبی و قدرت تشخیص آزمایش‌های مختلف در شناسایی بیماری بر حسب این که حیوان در چه مرحله‌ای از بیماری به سر می‌برد، بسیار متغیر می‌باشد. در نتیجه به منظور تشخیص دقیق بیماری توصیه می‌گردد که از نوعی رویکرد تشخیصی که در بردارنده آزمون‌گری‌های چندگانه می‌باشد، استفاده گردد زیرا هیچ آزمایشی به تنهایی نمی‌تواند تمامی حیوانات آلوده را شناسایی کند (Shaw & Day, 2005).

تشخیص لیشمانیوزیس با توجه به شرایط اپیدمیولوژیک، علائم بالینی و نتایج تست‌های آزمایشگاهی به دست می‌آید (Elsheikha et al. 2018). در اکثر سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی نوعی پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی پدید می‌آید و از آزمون تشخیصی سرمی به طور گسترده‌ایی استفاده می‌شود. آزمایشات سرولوژی گسترده و متنوعی در دسترس هستند که شامل ایمنوفلورسانس مستقیم (IFA)[1]، آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)[2]، آزمایش الایزا، الیزای نقطه‌ایی (dot-ELISA)، الایزای رقابتی و روش لکه‌گذاری وسترن می‌باشد. با وجود اختلافاتی در حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی هر یک از آزمایشات مذکور، تمامی آزمایشات، قابل قبول هستند (Shaw & Day, 2005).

در حال حاضر از چندین دارو برای درمان لیشمانیوز سگ‌ها استفاده می‌گردد. مداوا با این داروها در اغلب موارد به بهبودی حیوان ختم می‌شود ولی به ندرت منجر به حذف انگل یا جلوگیری کامل از بازگشت بیماری می‌گردد (Shaw and Day, 2005). در سال ۲۰۱۸، واکسنی جهت کنترل این بیماری در سگ، در اروپا اجازه فروش پیدا کرده است (Lopes et al. 2018). دیده شدن علائم بیماری تنها در ۲۵ درصد مبتلایان به همراه عدم درمان قطعی و با توجه به نقش کلیدی سگ در انتقال بیماری به انسان، این بیماری را در سگ از اهمیت بهداشتی فوق‌العاده‌ای برخوردار نموده است (Shaw and Day 2005؛Mohebali et al. 2005). در سالیان گذشته مواردی از ابتلا به لیشمانیوز احشایی در اهالی شهرستان سمنان دیده شد که در یک مورد نویسنده مقاله در جریان درمان و بهبودی دخترکی هشت ساله قرار گرفت که به این بیماری مبتلا شده بود. با توجه به نقش اصلی سگ در انتقال بیماری و با توجه به این که تا کنون مطالعه‌ای بر روی لیشمانیوز احشایی در شهرستان سمنان انجام نشده بود، بر آن شدیم که مطالعه‌ای بر روی میزان شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی در سگ‌های شهرستان سمنان انجام دهیم.

مواد و روش کار

شهرستان سمنان با جمعیتی بالغ بر ۲۱۰۰۰۰ نفر، در شمال شرق کشور و در استان سمنان با جمعیت ۶۳۰۰۰۰ نفر، قرار گرفته است. شهرستان مذکور از سمت شمال با شهرستان‌های ساری و سوادکوه (استان مازندران)، از سمت مغرب با شهرستان سرخه، از سمت شمال غرب با شهرستان فیروزکوه (استان تهران) و از سمت شرق با شهرستان دامغان و از سمت جنوب با دشت کویر و استان اصفهان، همسایه است (Ebrahimi et al. 2018).

1- Immunofluorescence assay
2- Direct Agglutination Test

این مطالعه از نوع توصیفی و به روش مقطعی به مدت یکسال از تیر ماه ۱۳۹۶ تا تیر ماه ۱۳۹۷ به شکل تصادفی از مناطق مختلف شهرستان سمنان انجام شده است. در این بررسی، روش نمونه‌گیری به شکل خوشه‌ای چند مرحله‌ای بود. ابتدا شهرستان سمنان را به مناطقی تقسیم‌بندی نموده و به شکل تصادفی از مناطق مختلف نمونه‌گیری به عمل آمد. گروه هدف سگ‌های صاحب‌دار (سگ چوپان و خانگی) بودند. حجم نمونه با توجه به شیوع سرمی احتمالی در سگ‌های مربوطه (۱۰ درصد)، ضریب اطمینان ۹۵ درصد و حداکثر خطای ۵٪ ۱۴۰ نمونه تعیین گردید.

نمونه‌های خون از ورید صافن سگ تهیه شده و به داخل لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد منتقل گردیدند. نمونه‌های خون در کنار یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل شده و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. پس از جداسازی، پلاسما در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

به منظور بررسی سرمی، آنتی‌ژن در مجاورت رقت‌های مختلف پلاسمای نمونه‌های اخذ شده قرار داده می‌شود که در صورت حضور آنتی‌بادی اختصاصی در پلاسمای سگ مبتلا، پس از گذشت ۱۲ تا ۱۸ ساعت آگلوتیناسیون صورت خواهد گرفت. پس از تهیه رقت‌های به ترتیب ۱:۱۰، ۱:۲۰ تا۱:۱۲۸۰ از پلاسمای سگ‌های مشکوک با محلول رقیق کننده، پلیت‌ها را در جعبه‌ای قرار داده و به منظور این که آگلوتیناسیون بهتر صورت بگیرد به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس به رقت‌های ۱:۸۰ تا ۱:۳۲۰، ۵۰ لاندا از سوسپانسیون آنتی‌ژن DAT اضافه شد. این آنتی‌ژن در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران درست شده و در تهیه آن تغییراتی به روش دکتر هریت داده شده بود (Mohebali et al. 2006). پیش از استفاده از سوسپانسیون آنتی‌ژن DAT، بایستی پلیت‌ها به آرامی تکان داده شوند تا کاملا یکنواخت گردند. پس از اضافه کردن آنتی‌ژن مربوطه، پلیت‌ها را مجددا در اتاقک مرطوب قرار داده و بعد از ۱۳-۱۸ ساعت نتایج قرائت گردید. برای تفسیر آزمایش، پلیت را روی سطح سفید قرار داده و چنانچه در حفره‌ای که آنتی‌ژن در آن ریخته شده بود، انگل‌ها به صورت یک تکمه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملا جمع شده و در وسط حفره میکروپلیت ته نشین شده بودند عدم آگلوتیناسیون شده تلقی و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا منفی به حساب می‌آمد و اگر انگل‌ها به حالت کلوئیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع موجود در حفره پراکنده شده یا به اصطلاح آگلوتینه شده بودند، نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت محسوب می‌شدند (Fig 1). بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلوتیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیار پذیرفته شد. تیتر ۱:۸۰ هر چند در گزارش می‌آید، منفی تلقی می‌گردد، ۱:۱۶۰مشکوک و ۱:۳۲۰ به بالا مثبت در نظر گرفته خواهد شد (Mohebali et al. 2006). به منظور جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب و تعیین دقیق تیتر، نمونه‌های با تیتر ۱:۸۰ به دست آمده از مرحله‌ی اول screening، تا ۱:۵۱۲۰رقیق شده و مجددا به آن‌ها آنتی‌ژن اضافه شد و آزمایش گردیدند (Bamorovat et al. 2014; Mohebali et al. 2006). داده‌ها با استفاده از آزمون توصیفی و آزمون کای مربع و تست دقیق فیشر به کمک نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

به منظور تشخیص قطعی و جداسازی تک‌یاخته، یکی از سگ‌های سرم مثبت (عیار ۱:۲۰۴۸۰)، پس از معاینه‌ی بالینی، کالبدگشایی گردید و از بافت‌های طحال، کبد، مغز استخوان نمونه‌گیری به عمل آورده شد (بر اساس کد اخلاق شماره ۹۶-۴۰). از بافت‌های مربوطه، گسترش داب تهیه شد و با روش رنگ‌آمیزی گیمسا رنگ‌آمیزی گردید.

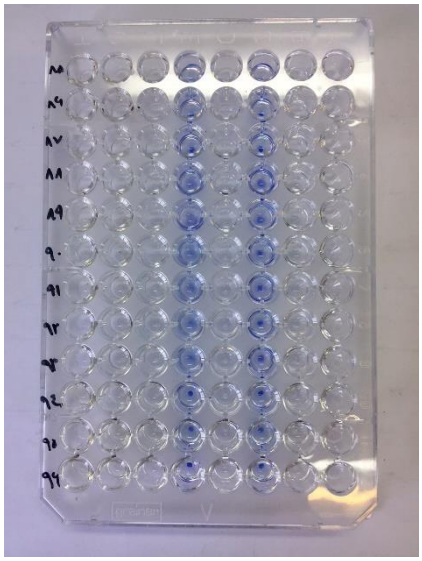

Fig 1. Plate used in agglutination test. In wells with a blue button, the serum is not agglutinated and the result is negative (well 94). In wells with a uniform color, the serum is agglutinated and the result is positive (well 88).

نتایج

در این مطالعه، آنتی‌بادی ضد لیشمانیا در ۱۱ قلاده سگ دارای حداقل عیار ۱:۸۰ و بالاتر داشتند. آنتی‌بادی ضد لیشمانیا در تیتر ≤۱:۳۲۰ در چهار نمونه (دو نمونه از سمنان، دو نمونه از مهدی‌شهر) مشاهده شد. عیارهای به دست آمده از این چهار نمونه ۱:۳۲۰ (دو نمونه)، ۱:۵۱۲۰ و ۱:۲۰۴۸۰ گزارش شده است. به عبارتی دیگر ۲/۹ درصد (چهار قلاده) (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد : ۵/۷ درصد – ۰/۱ درصد) از سگ‌ها از نظر حضور آنتی‌بادی اختصاصی لیشمانیوز احشایی مثبت و به این بیماری مبتلا بودند. اختلاف معنی‌داری بین جنسیت و ابتلا به لیشمانیوز احشایی مشاهده نگردید. میانگین و انحراف معیار سن سگ‌های مبتلا ۲/۲۲±۲۵/۶ ماه بوده است. هیچ کدام از سگ‌های زیر سه سال، آلودگی نداشتند. به علت تعداد کم موارد مثبت، سنجش ارتباط میان سن و آلودگی میسر نگردید (Table 1).

از نظر توزیع منطقه‌ای ۴/۳ درصد از سگ‌های منطقه سمنان و ۲/۱ درصد از سگ‌های منطقه مهدی‌شهر، مبتلا به لیشمانیوز احشایی بودند که به علت تعداد کم موارد مثبت، سنجش ارتباط میان توزیع منطقه‌ای و آلودگی میسر نگردید (Table 1).

همچنین از چهار قلاده سگ مبتلا، صاحبان سه قلاده سگ، سگ‌های خود را رها کرده بودند و از سرنوشت‌شان اطلاعی در دست نبود و موفق شدیم تنها یک سگ را مورد کالبدگشایی قرار بدهیم. در معاینه‌ی بالینی، هیچ ضایعه پوستی و زخمی بر روی سگ مشاهده نگردید. در بررسی کالبدگشایی، کبد و طحال (Fig 2) و غدد لنفاوی شدیدا متورم و بزرگ شده بودند. از اندام‌های مذکور به همراه مغز استخوان، نمونه‌گیری به عمل آورده شد. در نمونه‌ها، آماستیگوت لیشمانیا بوضوح مشاهده گردید (Fig. 3).

fig 2. Spleen enlargement with hyperemia in the dog with visceral leishmaniasis. Photo by the author

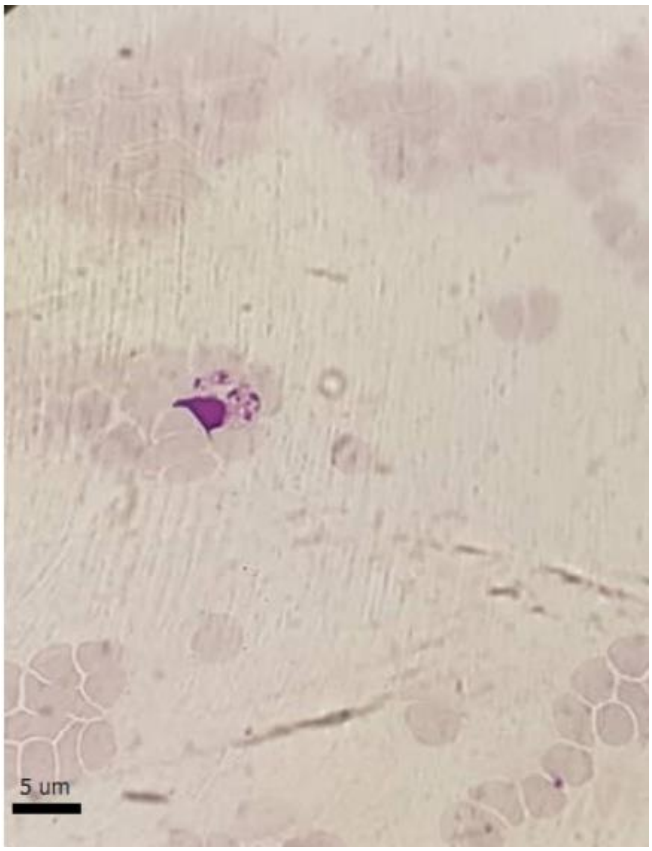

Fig 3. Amastigote stage of Leishmania in lymph node - Giemsa staining..Magnification × 1000 Photo by the author

Table 1. Seroepidemiology of visceral leishmaniasis in the owner dog in Semnan

Variable		Positive serum	Negative serum	Total	ρ-value
Age	≤ 1	0	37	37	0/577
	1 -3	0	67	67	
	≥ 3	4	32	36	
Sex	Male	1	96	97	0/587
	Female	3	40	43	
Location	Semnan	2 (1:320)	46	48	0/598
	mahdishahr	2 (1:5120) (1:20408)	96	98	
Total		4	136	140	

بحث

لیشمانیوز احشایی زئونوتیک از بیماری‌های بسیار خطرناک و با مرگ و میر بالا در انسان محسوب می‌شود. این بیماری در بعضی از نقاط ایران شامل اردبیل، آذربایجان شرقی، استان فارس و تا اندازه‌ای در استان بوشهر، خراسان شمالی، کرمان و قم به صورت بومی در انسان و سگ دیده می‌شود؛ در مابقی نقاط کشور ایران، این بیماری به صورت تک‌گیر وجود دارد (Mohebali et al. 2018). در سالیان اخیر گزارش‌های پراکنده‌ای به صورت شفاهی مبنی بر وقوع لیشمانیوز احشایی در شهرستان سمنان در انسان گزارش شده است که به وسیله روش‌های انگل‌شناسی نیز

به تایید رسیده‌اند. با توجه به نقش کلیدی سگ در بروز بیماری لیشمانیوز احشایی در انسان، از آن جا که تاکنون مطالعه‌ای راجع به خصوصیات اپیدمیولوژیک عفونت احشائی به لیشمانیا در سگ‌های شهرستان سمنان انجام نشده بود، بر آن شدیم مطالعه‌ای با روش سرواپیدمیولوژی در این شهرستان انجام دهیم.

در لیشمانیوز احشایی زئونوتیک، سگ‌سانان از مخازن اصلی بیماری در جامعه هستند. اندازه‌گیری میزان شیوع بیماری در سگ، در کنترل این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است بر اساس مطالعات متعدد انجام شده توسط محققین مختلف، DAT یک روش ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و قابل اجرا در مناطق بومی برای تشخیص لیشمانیوز احشایی و مطالعات سرواپیدمیولوژی بوده و می‌تواند جایگزین مطمئنی برای روش‌های پرهزینه IFAT و ELISA باشد (Mohami et al. 2006; Moshfe et al. 2009; DorostkarMoghadam, 2005; Fakhar and Ahmadpour, 2013). بر اساس مطالعه انجام گرفته، ۱۱ قلاده سگ از ۱۴۰ سگ مورد مطالعه، احتمال ابتلا به لیشمانیوز را داشتند (تیتر بالاتر از ۱:۸۰). مطالعات تکمیلی بر روی سرم سگ‌های مشکوک نشان داد که میزان شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی در سگ‌های صاحب‌دار (سگ-های خانگی و گله) شهرستان سمنان با عیار مرزی بالاتر از تیتر ≤۱:۳۲۰در چهار نمونه (دو نمونه از سمنان، دو نمونه از مهدی‌شهر) مشاهده می‌شود. عیارهای به دست آمده از این چهار نمونه ۱:۳۲۰ (دو نمونه)، ۱:۵۱۲۰، ۱:۲۰۴۸۰ گزارش شده است. به عبارتی دیگر ۲/۹ درصد (چهار قلاده) (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد : ۵/۷ درصد - ۰/۱ درصد) از سگ‌ها از نظر حضور آنتی‌بادی اختصاصی لیشمانیوز احشایی مثبت و به لیشمانیوز احشایی مبتلا بودند.

ناقل بیماری لیشمانیوز احشایی، گونه‌های مختلفی از پشه فلبوتوموس می‌باشد. با توجه به زیستگاه پشه مذکور که در زمین‌های گلی و مرطوب می‌باشد، به نظر می‌رسد که درمناطق با آب و هوای گرم و خشک، میزان بروز لیشمانیوز احشایی بسیار کم باشد (Mohebali et al. 2005; Shaw and Day, 2005). میزان شیوع گزارش شده با مطالعات انجام شده در گرمسار (Mosallamejad et al. 2007) مناطق مرکزی و جنوب غربی ایران (Hosseininejad et al. 2012)، زاهدان (Mirhadavi et al. 2016) و جهرم (Farzam, 2008) که از لحاظ وضعیت آب و هوایی با سمنان مشابهت دارند، تقریبا مشابه است. در بررسی سرواپیدمیولوژیک که در سگ‌های شهرستان گرمسار که به روش آگلوتیناسیون مستقیم در زمستان ۱۳۸۳ انجام شده بود، از ۱۲۰ قلاده سگ‌های بومی شهرستان گرمسار (جمع‌آوری شده از ۱۲ روستا)، میزان شیوع عفونت لیشمانیوز احشایی ۴/۱۷ درصد گزارش گردید (Mosallamejad et al. 2007). همچنین در مطالعه‌ایی که به بررسی سرولوژیک شیوع لیشمانیوز احشایی در سگ‌های بدون علائم بالینی در مناطق مرکزی و جنوب غربی ایران انجام شده بود. از ۵۴۸ قلاده سگ، در ۵۳ مورد از سگ‌ها برابر با ۹/۶۷ درصد آنتی‌بادی ضد *لیشمانیا اینفانتوم* جدا شد (Hosseininejad et al. 2112). در مطالعه‌ی دیگری در شهرستان زاهدان و در طی یک سال که بر روی تعداد ۱۵۰ قلاده سگ ولگرد انجام گردیده بود، فراوانی کلی بیماری لیشمانیوز احشایی در این بررسی ۳/۵ درصد برآورد گردید (Mirhadavi et al. 2016). همچنین در مطالعه‌ای دیگر در شهرستان جهرم بر روی ۴۳۱ قلاده سگ گله، میزان شیوع سرمی در حدود ۷/۶ درصد تعیین گردید (Farzam et al. 2008).

اما در بررسی انجام گرفته در نقاط مختلف استان کرمان، بر روی ۱۱۶ قلاده سگ خانگی، میزان شیوع ۱۲/۹۳ درصد برآورد گردید که به تفکیک در شهرستان‌های کرمان، بافت و بم ۷/۴ درصد، ۱۸/۷۵ درصد و ۲۳/۵ درصد بود (Aflatoonian et al. 2012). بالاتر بودن میزان شیوع بیماری در شهرستان بافت و بم که شرایطی مشابه با سمنان را دارند، نشان‌دهنده‌ی این است که متغیرهای دیگری به جز آب و هوا در میزان شیوع بیماری مؤثر خواهد بود.

در مطالعاتی که در مشکین شهر، استان گلستان و شهرستان مشهد انجام پذیرفته است، میزان شیوع سرمی در سگ‌ها بالاتر بود. در یک تحقیق سرواپیدمیولوژی در مشکین‌شهر، ۲۰۴ قلاده سگ تحت آزمایش DAT قرار گرفتند. میزان شیوع سرمی ۱۵/۱۹٪ بود (Moshfe et al. 2009). همچنین در مطالعه‌ای دیگر در استان گلستان بر روی ۱۵۰ قلاده سگ، میزان آلودگی ۱۵/۳٪ (Namroodi and Saberi 2015) و در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی میزان شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی در سگ‌های شهرستان مشهد انجام گرفت، از ۱۴۲ نمونه خون، ۱۲٪/۶۷ نمونه‌ها مثبت بودند (Sabzevari et al 2013). علت آلودگی بیش‌تر در سگ‌ها در این مناطق احتمالا به دلیل شرایط محیطی مساعدتر برای زاد و ولد پشه خاکی (رطوبت و دمای مناسب‌تر، وزش بادهای موسمی با سرعت کم‌تر) از یک طرف و از طرف دیگر تراکم بیش‌تر جمعیت انسانی در این مناطق می‌باشد که منجر به شیوع بیش‌تر بیماری در انسان و سگ در این مناطق شده است (Moshfe, 2009).

نتایج یک پژوهش در ترکیه، حاکی از آن است که شیوع سرمی لیشمانیوز در سگ‌ها در شهر دنیزلی ۲۰/۷ درصد است (Ozensoy et al. 2009). در مطالعه‌ی دیگر که در نواحی غربی ترکیه انجام گرفت، میزان شیوع بیماری در سگ، ۵/۳ درصد گزارش گردید (Ozbel et al. 2000). Strelkova در سال ۲۰۱۵ مروری بر لیشمانیوز احشایی در کشورهای آسیای میانه انجام داد. در آذربایجان ۱/۴ تا ۷/۱ درصد سگ‌ها به لیشمانیوز احشایی مبتلا بودند. در گرجستان میزان شیوع سرمی در سگ‌ها ۲۱/۵ تا ۲۸/۵ درصد گزارش گردید (Strelkova et al. 2015).

به نظر می‌رسد که بر خلاف نژاد سگ، که یکی از متغیرهای مهم در ابتلا سگ به این بیماری است (Shaw and Day, 2005)، نوع سگ به لحاظ خانگی و یا گله در ابتلا به بیماری تاثیری نداشته باشد. در مطالعه انجام گرفته در شهرستان سمنان، از چهار قلاده مبتلا به لیشمانیوز، سه قلاده سگ خانگی و یک قلاده سگ گله بود. به علت تعداد کم موارد مبتلا، نمی‌توان اختلاف مذکور را معنی‌دار تلقی نمود. در مطالعه انجام گرفته در مشهد هم، اختلاف معنی‌داری در میزان آلودگی لیشمانیوز احشایی سگ‌های خانگی در مقایسه با سگ‌های گله و ولگرد مشاهده گردید (P<0/01) (Sabzevari et al. 2013). در مطالعه‌ی دیگر بر روی سگ‌های مناطق مرکزی و جنوب غربی کشور، شیوع سرمی عفونت در سگ‌های خانگی به طور معنی‌داری کم‌تر از میزان آن در سگ‌های آزاد (نگهبان یا ولگرد) بود (P<0/001) (Mohebali et al. 2001). نتایج متناقض نشان‌دهنده این است که به نظر نمی‌رسد که نحوه‌ی استفاده از سگ در میزان بیماری مؤثر باشد.

عموماً تنها در ۲۵ درصد سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی در ایران، علائم بالینی مشاهده می‌گردد (Mohebali et al. 2005; Mohebali et al. 2018; Mazloomi et al. 2002; Mohebali, 2012). مهم‌ترین علائم بالینی شامل لنفودنوپاتی، عوارض پوستی، بزرگ شدن طحال و لاغری می‌باشد (Mohebali, 2002; Shaw and Day, 2005). مطالعه‌ای طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۳ در شهرستان مشکین شهر انجام گرفت در این مطالعه از مجموع ۱۱۰ قلاده سگ خانگی اعم از واجد علائم (۲۴ قلاده) و یا فاقد علائم بیماری (۸۶ قلاده) نمونه سرم گرفته شد و با روش DAT مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله از ۲۴ قلاده، سگ‌های دارای علائم بالینی تعداد ۲۰ مورد برابر با ۸۳/۳ درصد و از ۸۶ قلاده سگ فاقد علائم، ۱۶ مورد برابر با ۱۸/۶ درصد با آزمایش DAT مثبت بودند (Molai et al. 2016). در مطالعه‌ای که در شهرستان جهرم انجام پذیرفت، تنها در یک سگ، علائم پوستی و بزرگ بودن طحال مشاهده شد و مابقی سگ‌ها، علیرغم آلودگی، علائمی را از خود نشان نمی‌دادند (Farzam et al. 2008). در مطالعه‌ی حاضر، تنها در یک سگ علائم بیماری شامل بزرگی طحال، کم‌خونی و لاغری مشاهده گردید. وجود ضایعات پاتولوژیک بر روی سگ از مواردی است که در انتقال بیماری نقش بازی می‌کند. البته امروزه مشخص شده است که سگ‌های فاقد علائم بیماری نیز در

انتقال بیماری نقش بازی می‌کنند (Mohebali, et al. 2006; Mohebali et al. 2001; Molai et al. 2016; Edrissian et al. 1381). به عبارت دیگر ندیدن زخم و ضایعات پوستی بر روی بدن سگ، موجب نمی‌گردد که سگ را به عنوان مخزن بیماری در نظر گرفته نشود. دیده نشدن علائم بیماری در سگ، غربال‌گری این بیماری را در سگ‌ها واجد اهمیت می‌سازد.

در مطالعه حاضر هیچ یک از سگ‌های زیر سه سال، آلودگی نداشتند. آزمون آماری در مورد جنس و سن مبتلایان در مطالعه حاضر معنی‌دار نبود (P=۰/۵۷۷)، اما به دلیل پایین بودن تعداد نمونه‌های مثبت، قابل اعتنا نمی‌باشد. در مطالعه‌ی Hosseininejad و همکاران، میزان عفونت در سگ‌های مسن‌تر از دو سال به طور معنی‌داری در مقایسه با سگ‌های جوان‌تر بالاتر بود (Hosseininejad et al. 2012). در مطالعه‌ی افلاطونیان و همکاران، آلودگی در گروه سنی بالای پنج سال به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه سنی زیر پنج سال بود (Aflatoonian et al. 2012). همچنین در مطالعه‌ی Namroodi و همکاران، فراوانی آلودگی در سگ‌های بالای چهار سال بیش‌تر بود (Namroodi et al. 2012). با توجه به مطالعات فوق شیوع بیماری در سگ‌های با سنین بالاتر بیش‌تر می‌باشد که علت آن مدت زمان بیش‌تری است که سگ‌ها در معرض گزش پشه ناقل می‌باشند. ولی در مطالعه ما ارتباط بین سن و آلودگی معنی‌دار نبود که علت آن می‌تواند تعداد کم نمونه‌های مثبت شده باشد.

امروزه نگهداری سگ در منازل به عنوان حیوان خانگی بسیار زیاد شده است ولی متاسفانه قانون مدونی که صاحبین سگ‌های خانگی را ملزم به همکاری با سازمان دامپزشکی نماید، وجود ندارد و بایستی با تدوین قوانینی در رابطه با نگهداری حیوانات خانگی در منازل، در این زمینه تمهیدات لازم اندیشیده شود. بدیهی است نبود قوانین، شرایطی را فراهم می‌سازد که انتقال بیماری از سگ به انسان تسهیل شده و بهداشت عمومی را به خطر خواهد انداخت.

با توجه به این که تک‌یاخته لیشمانیا از مغز استخوان سگ مبتلا جدا شده و در رنگ‌آمیزی گیمسا مشاهده گردید و با توجه به گزارش‌های محدود از بروز لیشمانیوز احشایی در انسان در شهرستان سمنان و مهدی‌شهر، به نظر می‌رسد که پتانسیل ابتلا به بیماری در انسان و سگ‌های منطقه وجود دارد که از لحاظ بهداشتی، دارای اهمیت به سزایی می‌باشد. مطالعات بعدی بایستی در شناسایی کانون‌های بیماری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر علی مهدوی و سرکار خانم دکتر سحر غفاری‌خلیق به خاطر تحلیل آماری و کالبدگشایی سگ مبتلا تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بدینوسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه از محل اعتبار پژوهانه سال ۱۳۹۴ دانشگاه سمنان انجام شده است که بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه قدردانی و تشکر می‌گردد.

منابع

Aflatoonian M.R., Akhtardanesh, B., Sharifi I., Mostafavi M., Aflatoonian B. and Khalili M. (2012). Seroepidemiology of canine visceral leishmaniosis in kerman city. Journal of Kerman University Medical Sciences, 19(6): 531-539 [Article in Persian].

Bamorovat M., Sharifi I., Mohammadi M.A., FasihiHarandi M., Mohebali M., MalekpourAfshar R, et al. (2014). Canine Visceral Leishmaniasis in Kerman, Southeast of Iran: A Seroepidemiological, Histopathological and Molecular Study. Iranian journal of parasitology, 9(3), 342-342.

DorostkarMoghadam D., Hejazi H. and Ghasemi M. (2005). Evaluation and comparison of serological methods of indirect immunofluorescence and direct agglutination using standardized antigen for the detection of visceral leishmaniasis. Journal of Mazandaran University Medical Sciences, 15(49): 1-8 [Article in Persian].

Ebrahimi M., Rad Goudarzi M., Yusoff K. (2018).The Dynamics of Iranian Borders: Issues of Contention. New York. Springer edition.

Edrissian G.h., Mohebali M., Hajjaran H., Arshi S., Atari M.R., Frouzani, A.R et.al. (1381). Kala azar case finding using direct agglutination test. Journal of school health, 1.1.p 10-16 [Article in Persian].

Fakhar M., Ahmadpour A. (2013). Review of Laboratory Diagnostic Techniques for Visceral Leishmaniasis (Kala Azar). Medical Laboratory Journal, (7)1: 45-54 [Article in Persian].

Farzam M., Changizi E., Mohebali M., Akhoundi B. and SalimiBejestani M.R. (2008). Seroepidemiological survey of canine visceral Leishmaniasis in Jahrom city, Fars province. Iranian Veterinary Journal, 4(3): 58-67 [Article in Persian].

Hosseininejad M., Mohebali M., Hosseini F., Karimi S., Sharifzad S. and Akhoundi B. (2012). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs in Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 13(1): 54-57.

Lopes E.G., Sevá A.P., Ferreira F., Nunes C.M., Keid L.B., Hiramoto R.M et al. (2018). Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of Leishmania infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. Epidemiology and infection, 146(3), 401-406.

Mazloomi S., Mohit H., Edrissian G.H., Mohebali M. and Davies C.R. (2002). Domestic dog ownership in Iran is a factor for human infection with *Leishmania infantum*. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 67(5), 511-515.

Mirhadavi H., Salim K.A., Sohrabnahad A., Hydarian P. and Bizhani N. (2016). Species Identification and Molecular Typing of Leishmania Spp. Using Targeting HSP70 Gene in Suspected Patients of Cutaneous Leishmaniasis from Sistan and Baluchestan Province, Southeast Iran. Iranian Journal of parasitology, 11(4): 489-498.

Mohami M., Mohebali M., Keshavarz H., Hajaran H. and Zarei Z. (2006). Seroepidemiologic study of visceral leishmaniasis in Germi city of Ardebil province. Journal of School Public Health Institute, 4(1): 45-55 [Article in Persian].

Mohebali M., Edrissian Gh.H., Nadim, A., Hajjaran H., Akhoundi B., Hooshmand B. et al. (2006). Application of Direct Agglutination Test (DAT) for the Diagnosis and Seroepidemiological Studies of Visceral Leishmaniasis in Iran. Iranianian Journal of Parasitology, Vol.1, No.1, pp. 15-25.

Mohebali M. (2012). Epidemiological Status of Visceral Leishmaniasis in Iran: Experiences and Review of Literature. Journal of Clinical & Experimental Pathology. S3, pp.12-34.

Mohebali M., Hajjaran H., Hamzavi Y., Mobedi I., Arshi S. and Zarei Z. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Veterinary parasitology, 15;129(3-4):243-51.

Mohebali M., Hamzavi Y., Fallah, E. and Zarei, Z. (2001). Study of canine visceral leishmaniasis in some parts of Islamic Republic of Iran and its health importance. Journal of Veterinary Resarch, 56(3), 55-60 (Full Text in Persian).

Mohebali M., Moradi-Asl E. and Rassi, Y. (2018). Geographic distribution and spatial analysis of *Leishmania infantum* infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review. Journal of Vector Borne Diseases. 55. pp. 173–183.

Molaei S., Dalimi A., Mohebali M., Zareii Z., Mohammadi-Ghalehbin B., Akhondi B. et al. (2016). Study of Canine Visceral 2 in Symptomatic and Asymptomatic Domestic Dogs in Meshkinshahr City, Iran. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 16(1): 105-115 [Article in Persian].

Mosallamejad B., Ranjbarbahadori Sh. and Moradi B. (2007). Sero-epidemiological investigation of visceral leishmaniasis in local dogs of Garmsar. Journal of Veterinary Microbiology, Azad Univ. 3(2): 59-65 [Article in Persian].

Moshfe A., Mohebali M., Edrissian G.H., Zarei, Z., Akhoundi B., Kazemi B. et al. (2006). Seroepidemiological study on canine visceral leishmaniasis in Meshkinshahr district, Ardabil province, Northwest of Iran during 2006-2007. Iranian Journal of Parasitology. 3(3): 1-10.

Moshfe A., Zarei Z., Akhoundi B., Edrisian G.H., Kazemi B., Jamshidi Sh. et al. (2009). Comparison between Serology and PCR Methods for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Armaghan Danesh. 4 (12): 31-42 [Article in Persian].

Namroodi S., Saberi M. (2015). Seroepidemiology of *Leishmania infantum* in Rural Dogs in Golestan Province, Iran (2012 to 2014)). Medical Laboratory Journal. 9(2): 97-102[Article in Persian].

Ozbel Y., Oskam L., Ozensoy S., Turgay N., Alkan MZ., Jaffe CL., Ozcel MA. (2000) A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. Acta tropica. 47(1): 1-6.

Ozensoy Toz S., Sakru N., Ertabaklar H., Demir S., Sengul M., Ozbel Y. (2009). Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli province, Aegean Region, Turkey New Microbiology 32(1): 93-100.

Sabzevari S., Razmi G.R., Naghibi A. and Khoshnegah J. (2013). A serological study of *Leishmania infantum* in dogs of Khorasan Razavi province, Iran. Journal of Parasitic Disuses. 37(2):189-91.

Shaw S., Day M. (2005). Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. London, CRC Press; PP: 89-99.

Strelkova MV., Ponirovsky EN., Morozov EN., Zhirenkina EN., Razakov SA., Kovalenko DA., Schnur LF., Schönian G. (2015). A narrative review of visceral leishmaniasisin Armenia, Azerbaijan, Georgia, Kazakhstan,Kyrgyzstan, Tajikistan, Turkmenistan, Uzbekistan,the Crimean Peninsula and Southern Russia. Parasites & Vectors, 8:330, 1-18.

Received:02.09.2019
Accepted: 29.02.2020

Vol. 17, No. 2, Summer, 2021 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2020.190542.2175
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.7.0

Seroprevalence of Visceral Leishmaniasis in Dogs of Semnan by direct agglutination test

Bahareh Fallah Alamdari[1], Emad Changizi[2*] and Mahdi Mohebali[3]

[1] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
[2] Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
[3] Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received:02.09.2019 Accepted: 29.02.2020

Abstract

The Mediterranean form of visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, is a potentially fatal vector-borne zoonotic disease caused by *Leishmania infantum*, which is sporadic in most parts of Iran, while in other parts it is considered endemic. Domestic dogs (*Canis familiaris*) are the primary reservoir hosts for human VL. The objective of the present study is to determine the seroprevalence of VL in the dogs with owners in rural areas of Semnan. For this purpose, 140 blood samples from dogs, which had no clinical signs, were taken randomly. Blood samples were tested by direct agglutination test (DAT) to detect the anti-Leishmania antibodies in dogs, using a cut-off value of ≥1:80. We considered anti-leishmanial antibodies titers at ≥ 1:320 with a clinical sign as Leishmania infection and at ≥ 1:80 with no clinical symptoms as parasitologically infected. Pathological specimens including spleen, liver, and lymph nodes from an infected dog (1:20480) were prepared for Dub smear in Laboratory and staining with Giemsa. Also, the stages of amastigote leishmaniawere had been observed in isolated tissues. The anti-Leishmania antibody (≥ 1:320) was detected in 4 dogs (2.9 %) of the total 140 studied dogs. No significant difference between VL infection and gender & age was found. The results of this study showed that VL with low endemicity is circulating in dogs of Semnan.

Key word: Visceral Leishmaniasis, Direct Agglutination Test, Dog, Semnan

* **Corresponding Author**: Emad Changizi, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
E-mail: echangizi@semnan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).