

# مطالعه شیوع سرمی لیشمانیوز احشائی در سگ‌های ولگرد اطراف شهرستان مرند (آذر بایجان شرقی) بروش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT) در سال ۸۷-۸۶ و اهمیت بهداشتی آن

مجید خانمحمدی<sup>۱\*</sup>، محمد صدقیان<sup>۲</sup>، فریدون بابائی نژاد<sup>۱</sup>، محمد ذکریازاده<sup>۳</sup>

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند-ایران.  
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر-ایران.  
۳- کارشناس سازمان دامپزشکی استان آذربایجان شرقی، تبریز-ایران.  
\* نویسنده مسئول: majid593@gmail.com

## Study on Seroprevalence of Visceral Leishmaniasis in stray dogs of Marand (East Azerbaijan) with indirect immuno fluorescence antibody test (IFAT) and its health importance 2006-2007

Khanmohammadi, M.<sup>1\*</sup>, Sadaghian, M.<sup>2</sup>, Babaey neghad, F.<sup>1</sup>, Zakaria Zadeh, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Marand Branch, Marand- Iran.

<sup>2</sup>Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar-Iran.

<sup>3</sup>Veterinary organization of East Azerbaijan, Tabriz- Iran.

### Abstract

This study was made to investigate the seroprevalence of zoonotic visceral Leishmaniasis (ZVL) among the stray dogs of Marand city and to find the possible relationship between the transmission of parasite from infected dogs to human beings. In this study 150 stray dogs for doing so to recognize seroprevalence of visceral Leishmaniasis with indirect immuno fluorescence antibody test (IFAT) blood sampling was made. The sera were conjugated with anti-leishmania infantom IgG antibodies and was examined with fluorescent microscope. All the investigated dogs were reported to be seronegative, from the point of view of infection to visceral Leishmaniasis. In spite of that fact that four dogs were 1:64 regarding antibody titer but taking into account the cut off degree all of the dogs were negative. In this study the antibody titer in male dogs were more than those of female dogs, however, it was not statistically significant ( $P < 0.05$ ). Considering the different animal reservoirs and various geographical animal conditions in this area and regarding the zoonotic parasite controlling the animal reservoirs, seems unavoidable and fight against the vector mosquito and controlling plans are necessary. *Vet.J. of Islamic Azad Univ., Garmsar Branch. 4, 2:69-72, 2008.*

**Keywords:** Seroprevalence- visceral leishmaniasis-dog-marand.

## چکیده

این تحقیق جهت بررسی شیوع سرمی لیشمانیوز احشائی زئونوتیک (ZVL) در میان سگ‌های ولگرد اطراف شهرستان مرند و بررسی احتمال وجود ارتباط بین سگ‌های آلوده، در انتقال انگل به انسان در سال ۸۶-۸۵ انجام گردید. در این مطالعه از ۱۵۰ قلاده‌سگ جهت تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز احشائی بروش ایمونوفلورانس غیر مستقیم (IFAT) خونگیری بعمل آمد. سرم‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های IgG آنتی لیشمانیا اینفانتوم گونژو که گردید و سرم‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی سگ‌های مورد مطالعه از نظر آلودگی به لیشمانیوز احشائی بصورت سرم منفی گزارش گردید. علی‌رغم اینکه ۳ قلاده‌سگ از نظر تیترا آنتی بادی بصورت ۶۴:۱ بودند، ولی با در نظر گرفتن درجه کات آف (Cut off) تمامی سگ‌ها از نظر سرمی منفی گزارش گردیدند. در این بررسی تیترا آنتی بادی در سگ‌های نر بیشتر از سگ‌های ماده بود، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). با توجه به وجود مخازن حیوانی مختلف و شرایط اقلیمی و جغرافیای جانوری متنوع در این منطقه و با در نظر گرفتن زئونوتیک بودن انگل، کنترل مخازن حیوانی اجتناب‌ناپذیر بوده و مبارزه با پشه‌های ناقل و برنامه‌های کنترلی لازم اجرا می‌باشد. محله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۷، دوره ۴، شماره ۲، ۶۹-۷۲.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز احشائی، IFAT، سگ، مرند.

## مقدمه

لیشمانیوز احشائی (کالا آزار) یکی از بیماری‌های عفونی - سیسمتیک است که از نظر بهداشتی دارای اهمیت فراوانی

می‌باشد (۲). لیشمانیوز احشائی در کشورهای خاورمیانه گسترش زیادی دارد و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم *L. infantum* می‌باشد (۸). لیشمانیا اینفانتوم توسط پشه‌های خاکی جنس



## مواد و روش کار

در این بررسی با هماهنگی صورت گرفته با اداره کل دامپزشکی و محیط زیست شهرستان مرند، مجموعاً ۱۵۰ قلاده سگ ولگرد از ۵ منطقه اطراف شهرستان مرند (ابرغان ۲۹ قلاده، فار ۲۴، اردک لو ۳۱، قره تپه ۲۷، کشکسرای ۳۹) با استفاده از روش گرفتن دستی و تله گذاری، اقدام به جمع آوری سگ‌های ولگرد گردید. در مرحله بعد اقدام به خونگیری از سگ‌های ولگرد گردید. انتخاب سگ‌ها تماماً بصورت تصادفی بود. از هر سگ به میزان ۷ میلی لیتر خون از ورید سفالیک یا سافن اخذ گردید (۳). لازم به ذکر است تمامی مشخصات سگ‌ها از نظر سن، جنس، رنگ و حتی محل و معاینات بالینی از نظر وجود علایم لیشمانیوز احشائی (ضایعات جلدی، ریزش مو، لاغری، بزرگی و پیچیدگی ناخن‌ها، لنفادنوپاتی، کراتیت، بزرگی شکم، واسهال) (۲). قبل از خونگیری در فرم‌های خاصی که به این منظور تهیه شده بود، ثبت گردید. نمونه‌های اخذ شده بعد از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی اقدام به جداسازی سرم گردید. و در نهایت سرم‌ها جهت تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم آماده گردیدند. از ۱۵۰ سگ تحت مطالعه ۵۳ سگ (۳۵/۳۳٪) ۲ ساله و ۹۷ سگ (۶۴/۶۶٪) بالای ۲ سال داشتند. تفکیکی از نظر نژاد در سگ‌ها اعمال نگردید. جهت تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم از آنتی ژن‌های پروماستیگوتی لیشمانیا اینفانتوم استرین (Ion49) که در محیط RPMi 1640 کشت داده شده بودند، همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fcs) استفاده شد. پروماستیگوت‌ها از محیط کشت برداشته شده و ۸ بار در فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شدند. انگل‌ها با استفاده از استون روی لام فیکسه شدند و سرم سگ‌ها با رقت ۱:۸ شروع به تست IFAT شدند (۸، ۱۱). پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم از بخش انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید. در این بررسی آنتی Igg سگ با استفاده از ایزوتیوسیانات فلورسین (Sigma®، F4012) کونژوگه گردید. میزان تیتراژ کونژوگه ۱:۲۲ بود. جهت تفسیر از کلید Arc، 1984 Abranches استفاده گردید (۱۱). طبق این کلید تیتراژ ۱:۲۸ بعنوان مثبت مورد قبول بود. در نهایت نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ المپیوس B×50 ساخت ژاپن (۲۰۰۴) مورد مطالعه قرار گرفتند.

فلبتوموس (*Phlebotomus*) و لوتزومیا (*Lutzomyia*) به سگ‌ها و انسان منتقل می‌گردد. سگ‌ها بعنوان میزبان اهلی و شغال‌ها و روباه‌ها بعنوان میزبان وحشی انگل مطرح می‌باشند. البته سایر مخازن حیوانی نظیر جوندگان هم بعنوان میزبان مطرح می‌باشند (۷). لیشمانیوز احشائی اولین بار در سال ۱۹۰۸ در کشور تونس بوسیله نیکول و کومت (Nicolle & comte) شرح داده شد. از آن به بعد گزارشات فراوانی از نقاط مختلف جهان در این مورد منتشر گردید. تا کنون حداقل چهار کانون اندمیک (Endemic) این بیماری در مناطقی از استانهای اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس، بوشهر و بتازگی استان قم، مورد مطالعه و تأیید قرار گرفته اند هر ساله موارد تک گیر (Sporadic) لیشمانیوز احشائی از سایر نقاط ایران گزارش می‌گردد. در کانونهای اردبیل و آذربایجان شرقی انگل لیشمانیای جدا شده از مخزن حیوانی، بعد از آزمایشات بیوشیمیایی (ایزو آنزیم)، از نوع انگل lon 49 *L. infantum* تعیین گردید. این انگل دقیقاً همان سویه ای است که در موارد متعدد جدا شده از افراد مبتلا به کالا آزار در استانهای یاد شده جدا گردیده است. بنابراین بطور قطع می‌توان گفت سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشائی مهمترین مخازن حیوانی این عفونت برای انسان محسوب می‌شوند (۳). لیشمانیوز احشائی سگ‌ها علاوه بر اهمیتی که در دامپزشکی دارد از نظر پزشکی و بهداشتی نیز از اهمیت بالائی برخوردار است (۲). لیشمانیوز احشائی در سگ‌ها به اشکال حاد و تحت حاد و مزمن و در موارد زیادی بدون علایم بالینی بروز می‌کند، که در اکثر مواقع منجر به مرگ حیوان مبتلا می‌گردد (۳). روش قطعی جهت تشخیص این بیماری در سگ‌ها استفاده از بیوپسی بافتی (طحال، مغز استخوان، کبد، غدد لنفاوی) در سگ‌های مشکوک به آلودگی و مشاهده اشکال آماستیگوت فرم انگل و یا کشت نمونه‌های بیوپسی شده در محیط‌های مغذی و مشاهده اشکال پروماستیگوت انگل می‌باشد، ولی همیشه این اشکال را براحتی نمی‌توان مشاهده کرد (۸). استفاده از روش‌های سرولوژی معتبر در شناسایی به موقع این عفونت در سگ‌ها اهمیت فراوانی دارد. روش IFAT یکی از روش‌های سرولوژی می‌باشد که حساسیت و ویژگی بالائی برای آن گزارش شده است (۲). مهمترین هدف این تحقیق شناسایی شیوع سرمی لیشمانیوز احشائی در سگ‌های ولگرد اطراف شهرستان مرند با استفاده از روش IFAT و نقش احتمالی سگ‌ها در انتقال این بیماری به انسان و اهمیت بهداشتی آن می‌باشد.



## نتایج

تست IFAT کاملاً حساس و اختصاصی است و بعنوان یک تست کیفی در تشخیص لیشمانیوز کاربرد دارد. تفسیر این آزمایش از اهمیت بالایی برخوردار است و به این علت است که اکثر افراد یا حیواناتی که دارای آنتی بادی علیه لیشمانیا می‌باشند، به عنوان بیمار لیشمانیایی تلقی می‌گردند و این خود می‌تواند بعنوان ریسک فاکتور مطرح باشد (۳). در این تحقیق فقط در منطقه ابرغان ۲ قلاده و در منطقه فارفار ۱ قلاده سگ دارای تیتراآنتی بادی ۰/۶۴ بودند که بصورت آنتی بادی مثبت بودند، ولی با در نظر گرفتن درجه Cut off از ۱۵۰ سگ مورد مطالعه تمامی سگ‌ها از نظر آنتی بادهای ضد لیشمانیا اینفانتوم بصورت سرم منفی بودند. بین میزان عفونت لیشمانیای احشائی سگ‌های نرو ماده از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ) که با نتایج سایر محققین در ایران مطابقت داشت (۱،۶).

## بحث و نتیجه‌گیری

سازمان بهداشت جهانی WHO عفونت ناشی از *L. infantum* را بعنوان یکی از بیماریهای مشترک مهم محسوب می‌کند (۸). لیشمانیوز احشائی نوع مدیترانه‌ای یکی از مهمترین و خطرناکترین بیماریهای قابل انتقال از حیوان به انسان می‌باشد. این بیماری در بیش از ۳۰ کشور جهان به شکل اندمیک وجود دارد. سگ و سگ سانان وحشی (روباه و شغال) مهمترین مخازن حیوانی لیشمانیوز احشائی در ایران بشمار می‌روند (۳). سگ به عنوان مهمترین منبع عفونت در مناطق اندمیک لیشمانیوز احشائی در ایران می‌باشد (۴،۹). چون اولاً جمعیت سگ در ایران زیاد است و بعد اینکه میزان آلودگی در سگ زیاد می‌باشد. و از همه مهمتر اینکه انگل به راحتی در خون یا زیر پوست سگ متمرکز شده و به آسانی در دسترس پشه خاکی‌ها قرار می‌گیرد (۴،۵). مطالعه انجام شده در شهرستان مشکین شهر از ۳۰۳ سگ آزمایش شده ۱۴ درصد به روش DA و ۲۰ درصد بروش IFA مثبت بودند (۱). در مطالعه دیگری توسط ادریسیان و آهن چین در شهرستانهای فیروز آباد، جهرم و قیر میزان عفونت سگ‌های بررسی شده با استفاده از روشهای DAT و IFA به ترتیب ۴۱/۶ و ۲۹/۱ درصد گزارش گردید (۶). در مطالعه دیگر توسط شریفی در سال ۱۹۹۶ پیرامون عفونت سگ‌های شهرستان بافت از استان کرمان با استفاده از روش‌های IFA و ELISA میزان عفونت سگ‌ها به لیشمانیوز احشائی به ترتیب ۱۸ و ۱۴ درصد گزارش

گردیده است (۱۲). در مطالعه دیگری توسط مجبلی و همکاران بین سالهای ۱۳۷۵ در مشکین شهر انجام گردید از ۱۶۴ سگ آزمایش شده در روستای قورت تپه مشکین شهر با استفاده از تست DAT و ELISA به ترتیب ۱۲/۲ و ۱۶/۴ درصد سرم مثبت گزارش گردیدند. در مطالعه‌ای دیگر در سال ۱۳۷۹ در روستای پریخان مشکین شهر از ۳۴۴ سگ آزمایش شده بوسیله تست DAT و ELISA به ترتیب ۴/۹ و ۹/۸ درصد سرم مثبت بودند در مطالعه دیگری در سال ۱۳۷۹ توسط همین گروه در شهرستان دشتی از ۱۰۵ سگ آزمایش شده بوسیله تست DAT و ELISA به ترتیب ۳/۸ و ۱/۹ درصد سرم مثبت بودند (۳).

در مطالعه‌ای که توسط بکائی و همکاران بروی سگ‌های مشکین شهر صورت گرفت تنها ۶/۱۳ درصد از سگ‌های سرم مثبت دارای علائم بالینی بودند و براساس نتایج حاصل از این مطالعه از ۲۲ قلاده سگ که تیتراآنتی بادی ضد لیشمانیا در آنها با استفاده از روش DAT تا ۲۰۴۸۰ می‌رسید، فقط ۱۲ قلاده سگ (۵/۵۴ درصد) دارای علائم بالینی بودند (۱). این موضوع از اپیدمیولوژی و انتقال لیشمانیوز احشائی به انسان فوق العاده مهم می‌باشد زیرا سگ‌های بدون علائم بالینی همانند سگ‌های با علائم بالینی قادر به انتقال عامل لیشمانیوز احشائی به انسان می‌باشند (۳). بنابراین جهت کنترل لیشمانیوز احشائی در مناطق اندمیک توصیه می‌شود، تمامی سگ‌های ولگرد نابود شده و سگ‌های صاحبدار بوسیله آزمایش‌های سرولوژی غربالگری شده و در صورت مثبت بودن آزمایشات فوق، نسبت به معدوم کردن آنها اقدامات لازم صورت گیرد (۳). در نهایت درمان افراد مبتلا بصورت جدی همراه با کنترل پشه‌های ناقل به شرطی که باعث تخریب محیط زیست و ایجاد خطرات بهداشتی در انسان نشود و تنظیم برنامه‌های کنترلی اقدامی موثر در پیشگیری از بیماری لیشمانیوز احشائی خواهد بود (۱۰).

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استادان ارجمند آقایان دکتر اسماعیل فلاح، دکتر ناصر حقوقی راد، دکتر صادق رهبری و آقای دکتر محمد حسین ذکریازاده کارشناس سازمان دامپزشکی استان آذربایجان شرقی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند که در تهیه این مقاله کمک‌های بی دریغ شان را مبدول داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمائیم.



10. Ozensoy Toz, S., Ertabakhar, H., ozbel, Y., Balcioglu, C., Yildizli, N., Ziya Alkan, M. (2005) Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in kusadasi, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim Sci.*, **29**: 23-26.
11. Semiao Santos, S.J., Abranches, P., Pereira, S., Games, S., Fernandes, J.P., Vetter, J.C.M. (1996) Reliability of serological Methods for Defection of Leishmaniasis in Portuguese Domestic and wild Reservoirs. *Mem Inst Oswald cru2, Rio de joneiro*, **91**(6): 747-750.
12. Sharifi, I., Daneshvar, H. (1994) The prevalence of visceral leishmaniasis in suspected canine reservoirs in southern Iran. *Iranians. Med. Sci.* **21**(3,4): 130-134.

## منابع

- ۱- بکائی، س.، ندیم، الف.، ادریسیان، غ.ح.، موبدی، الف. (۱۳۷۳) بررسی سرواپیدمیولوژیک سگ‌های کانون اندمیک لیشمانیوز احشایی (کالا آزار) در شهرستان مشکین شهر. دومین گردهمائی دامپزشکان علوم بالینی، ۳۰-۲۸ آبان.
- ۲- محبعلی، م.، فلاح، ا.، جمشیدی، ش.، حجاران، ه. (۱۳۸۰) ارزیابی روش سرولوژی الیزا با استفاده از آنتی ژن فیگوره در تشخیص آزمایشگاهی عفونت لیشمانیوز احشایی سگ. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، صفحه ۲۹-۳۲.
- ۳- محبعلی، م.، حمزوی، ی.، فلاح، ا.، زرعی، ز. (۱۳۸۰) مطالعه لیشمانیوز احشائی در سگ‌های بعضی از مناطق ایران و اهمیت بهداشتی آن. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، صفحه ۵۹-۵۵.
- ۴- محبعلی، م.، بهمن رخ، م.، موسوی فر، الف. (۱۳۷۶) مطالعه انگلشناسی و هیستوپاتولوژی لیشمانیوز احشائی در تعدادی از سگ‌های شهرستان مشکین شهر. پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، سال ۱۰، جلد ۴، صفحه ۱۲۵-۱۲۲.
- ۵- محبعلی، م. (۱۳۷۵) بیماریهای مشترک تک یاخته‌ای مشترک بین انسان و حیوانات. چاپ اول - نشر هادی صفحه ۵۱-۴۷.
6. Edrissian, Gh. H., Ahanchin, A.R., Gharachahi, A. M. (1993) Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in fars province. *Southern Iran. Tranian, J. Med. Sci.* **18** (3, 4): 99-105.
7. Fallah, E., Farshchian, M., Mazlomi, A., Majidi, J., Kusha, A., Mardi, A., Mahdi poorzareh, N. (2006) Study on the prevalence of visceral leishmaniasis in rodents of Azarshahr district (New focus), North West of Iran. *Archives of Razi Institute*, **61**(7): 27-33.
8. Handemir, E., Oncel, T., Kamburgil. (2004) Seroprevalence of visceral Leishmaniasis in stray Dogs in Istanbul. *TOP0D.* **28**(3): 123-125.
9. Mohebali, M., Fallah, E., Hajjaran, H. (1998) Vaccine trial against Canine Visceral leishemianiasis in the Islamic Republic of Iran. *E. Mediterr. Hlth, J.* **4**(2): 234-238.

