

## بررسی لیشمانیوز احشایی سگ و ارتباط آن با فاکتورهای التهابی و آنتی اکسیدانی در سگ‌های خانگی، گله و ولگرد

فاطمه آیرم<sup>۱</sup>، سهراب رسولی<sup>۲\*</sup>، بهار شمشادی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

### چکیده

لیشمانیوز احشایی سگ بیماری مشترک بین انسان و حیوانات است که ممکن است غلظت فاکتورهای آنتی اکسیدانی و التهابی را در سگ‌ها تغییر دهد. مطالعه حاضر به منظور بررسی لیشمانیوز احشایی سگ و ارتباط آن با فاکتورهای التهابی و آنتی اکسیدانی در سگ‌های خانگی، گله و ولگرد انجام شد. در این مطالعه، ۳۰ قلاده سگ خانگی، ۲۹ قلاده سگ گله و ۵۹ قلاده سگ ولگرد مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های خون از سگ‌ها جمع‌آوری شد و با استفاده از روش الیزا و واکنش زنجیره‌ی پلیمرز (PCR) بررسی شدند. نمونه‌هایی از پوست نیز جمع‌آوری شد، گسترش‌ها تهیه شد و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گیمسا و میکروسکوپ بررسی شدند. وضعیت کل آنتی اکسیدانی، غلظت‌های مالون دی آلدئید، اینترلوکین-۱، فاکتور نکروز تومور-آلفا و اینترفرون-گاما بررسی شدند. بر اساس نتایج الیزا، ۱۳ نمونه (۱۱/۱۰ درصد)، ۲ نمونه (۱/۶۹ درصد) و ۴ نمونه (۳/۳۸ درصد) به ترتیب برای سگ‌های ولگرد، خانگی و گله مثبت بودند. در روش واکنش زنجیره پلیمرز، ۱۹ نمونه (۱۶/۱۰ درصد)، ۳ نمونه (۲/۵۴ درصد)، و ۵ نمونه (۴/۲۳ درصد) به ترتیب برای سگ‌های ولگرد، خانگی و گله مثبت بودند. غلظت‌های سرمی فاکتورهای آنتی اکسیدان و التهابی به ترتیب در سگ‌های ولگرد آلوده در مقایسه با دیگر سگ‌ها، پایین‌تر و بزرگ‌تر بودند ( $P < 0/05$ ). ارتباط مثبت و معنی‌داری بین غلظت فاکتورهای التهابی و مالون دی آلدئید با لیشمانیوز وجود داشت. در مجموع، لیشمانیوز احشایی ارتباط نزدیکی با فاکتورهای آنتی اکسیدان و التهابی در سگ‌های ولگرد نشان داد.

**کلمات کلیدی:** لیشمانیوز، سگ، پاسخ‌های آنتی اکسیدانی، فاکتورهای التهابی

\*نویسنده مسئول: سهراب رسولی

آدرس: گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه

پست الکترونیک: sohrab\_rasouli86@yahoo.com

## مقدمه

پروتوزوهای انگلی جنس *لیشمانیا*، انگل‌های داخل سلولی هستند که باعث بیماری لیشمانیازیس می‌شوند (۳۵، ۶، ۲). بیماری لیشمانیوز باعث ایجاد عوارض جلدی-مخاطی کشنده و مهلک از طریق ایجاد اختلالاتی در احشاء و ارگان‌های داخلی می‌شود (۲۷). از نشانه‌های این بیماری، علائمی همانند ورم پوست، زخم‌های جلدی، کاهش وزن، اسهال، نقایص کلیوی و ... است (۱۱). بیماری لیشمانیوز باعث ایجاد عفونت‌های انگلی در انسان و سگ در سراسر جهان، مخصوصاً در کشورهای در حال توسعه (۳۱)، همانند ایران، افغانستان و سوریه می‌شود (۴). این بیماری هنوز یک خطر بزرگ در سراسر جهان است و مورد توجه پزشکان و دامپزشکان است (۱۵). در یک مقاله مروری در ایران در سال ۲۰۰۴، نشان داده شده است که شیوع بیماری لیشمانیوز ۱۶ درصد است (۲۶). لیشمانیوز سگی عمدتاً توسط *لیشمانیا اینفانتوم* ایجاد می‌شود و سگ‌ها یک منبع عمده‌ی آلودگی برای این بیماری به حساب می‌آیند (۲۱). سگ‌ها باعث می‌شوند که این انگل، چرخه‌ی زندگی‌اش را حفظ کند و باعث انتشار آن به انسان شود (۷). در این بین، سگ‌های ولگرد در مقایسه با سگ‌های صاحب‌دار، بیشتر مستعد آلودگی به لیشمانیا هستند (۱۷). در یک مطالعه، نمونه‌های خون از ۳۷ سگ ولگرد بدون علائم جمع‌آوری شد و نشان داده شد که ۲۱/۶۲ درصد از نمونه‌ها مثبت بودند (۳۳). سگ‌های آلوده، پاسخ ایمنی علیه انگل نشان می‌دهند، که عمدتاً توسط تیتراژ آنتی‌بادی تشخیص داده می‌شود (۳۰). تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی عفونت لیشمانیایی استفاده می‌شوند. این تکنیک‌ها عمدتاً شامل روش‌های انگل‌شناسی، سرولوژیکی و روش‌های مولکولی است (۹). عمدتاً روش‌های سرولوژیکی از

قبیل روش الایزا برای بررسی حضور آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد لیشمانیایی در سگ‌های آلوده استفاده می‌شود (۲۵، ۳۴). واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) و دیگر روش‌های مولکولی از این دست مانند quantitative-PCR, semi-nested-PCR, nested-PCR برای بررسی آلودگی با لیشمانیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۴). در مطالعه‌ای، از روش‌های تشخیص سرمی، مولکولی و بالینی برای بررسی لیشمانیوز در سگ استفاده شد و نشان داده شد که روش مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بیشتری در مقایسه با روش الایزا برخوردار بود (۱۸). از طرفی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیف با افزایش خطر لیشمانیوز وجود دارد (۳). برخی مطالعات همچنین گزارش کرده‌اند که لیشمانیوز پاسخ‌های التهابی را افزایش می‌دهد (۲۸، ۳۶).

اهمیت و ضرورت این مطالعه به این دلیل است که به بررسی شیوع آلودگی در سگ‌های ولگرد، خانگی و گله می‌پردازد تا با شناسایی مخازن آلوده (سگ‌ها) کمک کند تا اطلاعات مورد نیاز برای پیشگیری از بیماری مخصوصاً پیشگیری در انسان به دست آید و در زمینه‌ی پیشگیری و راه‌های مدیریتی کمک نماید تا شیوع آن به حداقل برسد و اقدامات لازم صورت گیرد. در درجه‌ی دوم، ضرورت این مطالعه به این جهت است که در صورت وجود ارتباط مثبت بین فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و التهابی با این بیماری، می‌توان از طریق دادن مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی از وقوع بیماری پیشگیری کرد و یا به درمان آن کمک نمود و یا از طریق تجویز داروهای ضد التهابی از شدت بیماری کاست. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی لیشمانیوز

استفاده از دستگاه الایزا و کیت‌های تجاری و بر طبق توصیه‌های شرکت سازنده بررسی شدند. غلظت‌های سرمی اینترلوکین-۱ بتا، فاکتور نکروز تومور-آلفا، و یانترفرون-گاما توسط کیت‌های تجاری (شرکت RayBiotech، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. محدوده تشخیص برای اینترلوکین-۱ بتا، فاکتور نکروز تومور-آلفا و اینترفرون-گاما به ترتیب ۸۰۰۰-۱۰ پیکوگرم/میلی‌لیتر، ۷۰۰-۲ پیکوگرم/میلی‌لیتر، و ۲۵-۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر بودند. بر اساس پروتکل شرکت، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم در هر چاهک ریخته شد، به مدت ۲/۵ ساعت پلیت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی بیوتین به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آویدین نشان‌دار به هر چاهک اضافه شد و برای ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از معرف سوبسترای تک مرحله ای TMB به هر چاهک اضافه شد و برای مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. در پایان، ۵۰ میکرولیتر محلول توقف به آن اضافه شد و نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شدند.

غلظت سرمی وضعیت کل آنتی‌اکسیدان، توسط روش کالری‌متری و ارزیابی کردن کاهش کاتیون ABTS انجام شد (۱۰). کاتیون ABTS براساس ظرفیت آنتی-اکسیدان‌ها بی‌رنگ می‌شود و تغییر رنگ در ۶۶۰ نانومتر بررسی شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی توسط TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) با استفاده از کیت تجاری (شرکت ZeptoMetrix، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت اندازه‌گیری شد. بر اساس پروتکل شرکت،

احشایی سگ و ارتباط آن با فاکتورهای التهابی و آنتی‌اکسیدان در سگ‌های خانگی، گله و ولگرد بود.

## مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر در منطقه ماکو در سال ۱۳۹۹ انجام شد و نمونه‌برداری در روستاهای ماکو به صورت تصادفی با کمک شبکه دامپزشکی شهرستان ماکو انجام گردید. از تعداد ۱۱۸ قلاده سگ، نمونه سرم تهیه و لام خونی تهیه گردید. تعداد ۳۰ نمونه از سگ‌های خانگی از طریق مراکز مایه‌کوبی شهرستان و تعداد ۲۹ نمونه خون‌گیری از روستاهای اطراف و تعداد ۵۹ نمونه از مرکز نگهداری سگ‌های ولگرد شهرستان نمونه‌برداری گردید. سگ‌های مورد مطالعه از هر دو جنس بصورت تصادفی انتخاب شدند که در محدوده سنی ۴ ماه تا ۱۰ ساله بودند. سگ‌ها از نظر فیزیکی بررسی شدند. در این مطالعه تمام تلاش‌ها انجام شد که درد در حیوانات به حداقل مقدار ممکن برسد و به این منظور از افرادی کمک گرفته شد که از مراقبت حیوانات آگاهی داشتند. از طعمه‌های مسموم برای به دام انداختن حیوانات استفاده نشد. نمونه‌هایی از پوست سگ‌ها جمع‌آوری شد و برای بررسی میکروسکوپی استفاده شدند. گسترش‌های تهیه شده توسط رنگ آمیزی می-گران والد گیمسا (May-Grünwald Giemsa) رنگ آمیزی شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. هر گسترش در بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شدند. به دنبال بررسی فیزیکی، نمونه‌های خون (۵ میلی‌لیتر) از سیاهرگ هر سگ گرفته شد و در لوله‌ها برای بررسی سرم استفاده شدند. برای انعقاد خون، نمونه‌های خون به مدت ۵ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی-گراد نگهداری شدند و سپس در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و با

۱ نانوگرم/میکرولیتر بود و کنترل منفی فاقد DNA الگو بود.

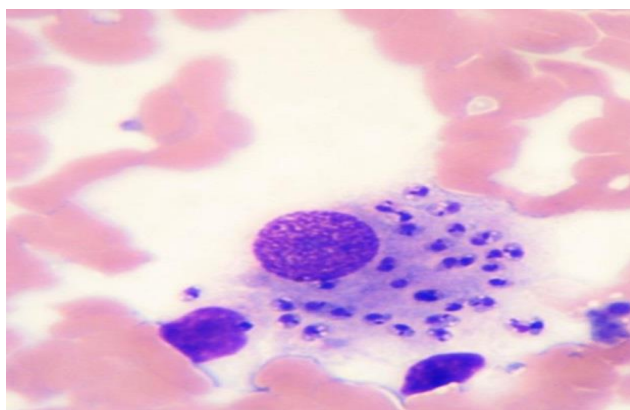
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ آنالیز شدند. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شدند. فراوانی‌ها محاسبه شد. از آزمون کای-اسکوئر برای بررسی اختلاف بین سگ‌های ولگرد، گله و خانگی استفاده شد. از آزمون کروسکال-والیس نیز برای بررسی اختلافات بین گروه‌ها استفاده شد. برای بررسی توافق بین روش‌های مختلف تشخیصی از ضریب کاپا استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین میزان لیشمانیوز با فاکتورهای التهابی از همبستگی اسپیرمن استفاده شد.

### نتایج

نتایج بخش میکروسکوپی ۱۵ نمونه را به‌عنوان نمونه‌های مثبت تشخیص داد. بر اساس نتایج به دست آمده ۱۰ نمونه، ۲ نمونه و ۳ نمونه برای سگ‌های ولگرد، خانگی و گله، مثبت بودند. این نتایج نشان می‌دهد که ۱۲/۷۱ درصد از نمونه‌ها در این روش مثبت بودند. بنابراین ۸/۴۷ درصد نمونه‌ها، ۱/۶۹ درصد، و ۲/۵۴ درصد به ترتیب برای نمونه‌های سگ‌های ولگرد، خانگی و گله مثبت بودند. شکل ۱، نمونه‌ای مثبت توسط رنگ آمیزی گیمسا

معرف TBA تهیه شد و نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر بررسی شدند.

برای انجام PCR، نمونه‌ها در بخش مولکولی طبق روش مطالعه قبلی بررسی شدند (۱). برای جداسازی DNA، از کیت DNG-plus (سیناکلون-ایران) استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه شامل 3'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-5' برای رفت و 3'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-5' برای برگشت بود. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شد. آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از مسترمیکس شرکت سیناکلون (۸ میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر آب، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۲ میکرولیتر پرایمرهای رفت و برگشت انجام شد. مراحل تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad، آمریکا) تکثیر شد. دمای واسرشته‌سازی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه بود، دمای اتصال ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای امتداد ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه بود. پروسه برای ۳۵ چرخه تکرار شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و زیر نور UV عکس‌برداری شد. اندازه محصول PCR با مارکر DNA شرکت سیناکلون ارزیابی شد. کنترل مثبت شامل *L. infantum* (MCAN/IR/97/LON 49) در غلظت

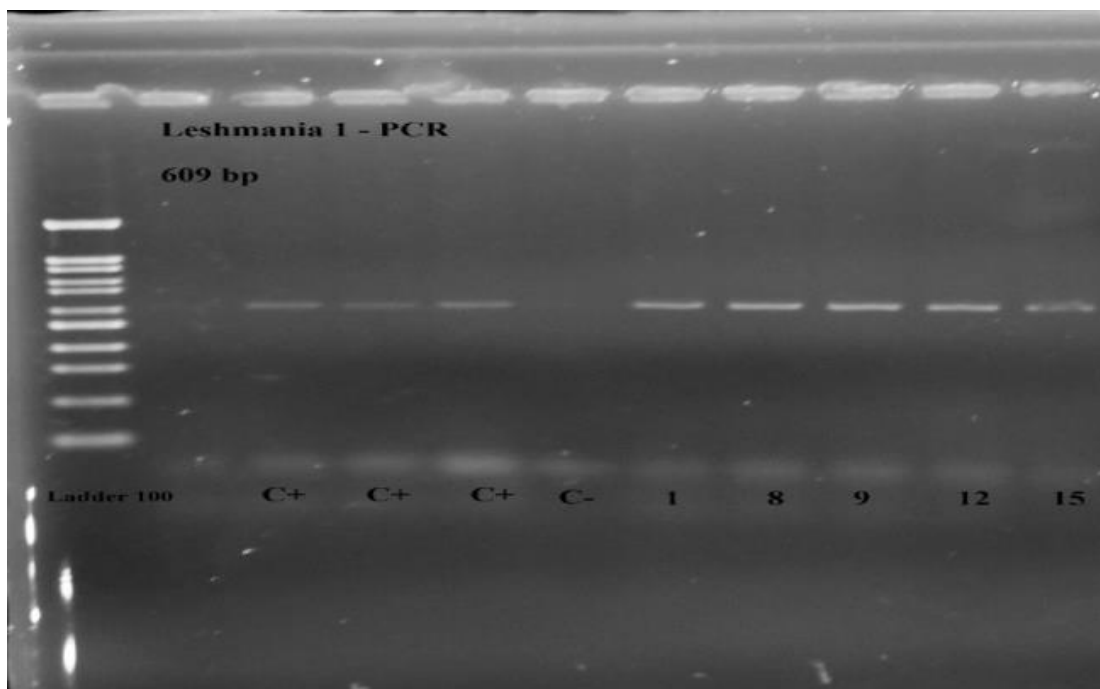


شکل ۱- نمونه مثبت رنگ آمیزی شده توسط رنگ آمیزی گیمسا

## بررسی لیشمانیوز احشایی سگ و ارتباط آن با فاکتورهای التهابی و... ۱۴۷

بودند. نتایج برای بخش مولکولی در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، ۲۷ نمونه به عنوان مثبت تشخیص داده شدند. نتایج این روش ۲۷ نمونه (۲۲/۸۸٪) را به عنوان نمونه‌های مثبت تشخیص داد. در این روش ۱۹ سگ ولگرد (۱۶/۱۰ درصد) به عنوان نمونه‌ی مثبت، ۳ سگ خانگی (۲/۵۴ درصد) و ۵ سگ گله (۴/۲۳ درصد) به عنوان نمونه‌ی مثبت تشخیص داده شدند.

نتایج بخش سرولوژیکی نشان داد که در این روش ۱۹ نمونه (۱۶/۱۰ درصد) به عنوان نمونه‌های مثبت تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد که ۱۳ نمونه، ۲ نمونه و ۴ نمونه برای سگ‌های ولگرد، خانگی و گله، مثبت بودند. این نتایج نشان می‌دهد که ۱۶/۱۰ درصد از نمونه‌ها برای این روش مثبت بودند. بنابراین ۱۱/۱۰ درصد نمونه‌ها، ۱/۶۹ درصد، و ۳/۳۸ درصد به ترتیب برای نمونه‌های سگ‌های ولگرد، خانگی و گله مثبت



شکل ۲- نمونه‌های مثبت توسط روش PCR. لاین‌های مثبت، کنترل مثبت را نشان می‌دهد. لاین منفی، کنترل منفی را نشان می‌دهد. لاین‌های ۱، ۸، ۹، ۱۲ و ۱۵ نمونه‌های مثبت را نشان می‌دهد.

نتایج برای غلظت سرمی فراسنج‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی، در سگ‌های غیر آلوده بزرگ‌تر از سگ‌های آلوده بود ( $p < 0/05$ ). میزان وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی در سگ‌های غیر آلوده حدود ۱ میلی‌مول/لیتر بود، در حالی که در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۰/۲۰، ۰/۳۵ و ۰/۴۰ میلی‌مول/لیتر بود. میزان مالون دی‌آلدئید در سگ‌های آلوده، بزرگ‌تر از سگ‌های غیر آلوده بود ( $p < 0/05$ ). میزان مالون دی‌آلدئید در سگ‌های غیر آلوده بین ۱۶ تا

روش میکروسکوپی ۱۲/۷۱٪، بخش سرولوژیکی ۱۶/۱۰ درصد نمونه‌ها را به عنوان نمونه مثبت تشخیص داد، در حالی که روش مولکولی ۲۲/۸۸٪ را به عنوان نمونه مثبت تشخیص داد. نتایج توافق خوبی بین روش‌های سرولوژیکی و میکروسکوپی را نشان داد (ضریب کاپا=۰/۰۰۰۱/۸۷۵،  $p < 0/0$ ). با این حال، نتایج توافق ضعیفی بین روش میکروسکوپی و مولکولی را نشان داد (ضریب کاپا=۰/۰۴۳/۳۴۵،  $p = 0/0$ ). نتایج توافق متوسطی بین روش سرولوژیکی و مولکولی را نشان داد (ضریب کاپا=۰/۰۱۲، ۰/۵۴۵،  $p = 0/0$ ).

۱۸ میکرومول/لیتر بود، در حالی که در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۲۸/۷۰، ۲۱/۴۰ و ۲۲/۷۰ میکرومول/لیتر بود. بر اساس نتایج، غلظت سرمی فاکتورهای التهابی، در سگ‌های آلوده بزرگ‌تر از سگ‌های غیر آلوده بود ( $p < 0/05$ ). میزان اینترلوکین-۱ بتا، فاکتور نکروز تومور آلفا و انترفرون گاما در سگ‌های غیر آلوده بترتیب حدود ۴۰ پیکوگرم/میلی-لیتر، ۴۴ پیکوگرم/میلی-لیتر و ۱۰ نانوگرم/میلی-لیتر بودند. غلظت اینترلوکین-۱ بتا در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۶۹/۲۰، ۵۲/۶۰ و ۵۳/۳۰ پیکوگرم/میلی-لیتر بودند. غلظت فاکتور نکروز تومور-آلفا در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۸۸/۳۰، ۶۳/۵۰ و ۶۱/۳۰ پیکوگرم/میلی-لیتر بودند. در ارتباط با غلظت انترفرون گاما، غلظت سرمی در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب

۱۸ میکرومول/لیتر بود، در حالی که در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۲۸/۷۰، ۲۱/۴۰ و ۲۲/۷۰ میکرومول/لیتر بود. بر اساس نتایج، غلظت سرمی فاکتورهای التهابی، در سگ‌های آلوده بزرگ‌تر از سگ‌های غیر آلوده بود ( $p < 0/05$ ). میزان اینترلوکین-۱ بتا، فاکتور نکروز تومور آلفا و انترفرون گاما در سگ‌های غیر آلوده بترتیب حدود ۴۰ پیکوگرم/میلی-لیتر، ۴۴ پیکوگرم/میلی-لیتر و ۱۰ نانوگرم/میلی-لیتر بودند. غلظت اینترلوکین-۱ بتا در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۶۹/۲۰، ۵۲/۶۰ و ۵۳/۳۰ پیکوگرم/میلی-لیتر بودند. غلظت فاکتور نکروز تومور-آلفا در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب ۸۸/۳۰، ۶۳/۵۰ و ۶۱/۳۰ پیکوگرم/میلی-لیتر بودند. در ارتباط با غلظت انترفرون گاما، غلظت سرمی در سگ‌های ولگرد، گله و خانگی آلوده بترتیب

نتایج برای همبستگی بین لیشمانیوز با اینترلوکین-۱ بتا (ضریب همبستگی = ۰/۸۴۶،  $p < 0/001$ )، فاکتور نکروزی تومور آلفا (ضریب همبستگی = ۰/۷۸۵،  $p < 0/001$ )، انترفرون گاما (ضریب همبستگی = ۰/۹۱۲،  $p < 0/001$ )، و مالون دی‌آلدئید (ضریب همبستگی = ۰/۶۴۹،  $p < 0/001$ )، ارتباط مثبت و معنی‌داری را نشان داد. نتایج همچنین یک همبستگی منفی بین لیشمانیوز با وضعیت آنتی‌اکسیدانی (ضریب همبستگی = -۰/۷۱۵،  $p < 0/001$ ) را نشان داد.

جدول ۱- غلظت سرمی فاکتورهای التهابی اینترلوکین-۱ بتا، فاکتور نکروز تومور-آلفا، و انترفرون گاما و غلظت مالون دی‌آلدئید و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در سگ‌های ولگرد، خانگی و گله آلوده و غیر آلوده به لیشمانیوز (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

سگ‌های مورد مطالعه	وضعیت آنتی‌اکسیدانی (میلی‌مول/لیتر)	مالون‌دی‌آلدئید (میکرومول/لیتر)	اینترلوکین-۱ بتا (پیکوگرم/میلی‌لیتر)	فاکتور نکروز تومور آلفا (پیکوگرم/میلی‌لیتر)	انترفرون گاما (نانوگرم/میلی‌لیتر)
ولگرد غیر آلوده	$0/90 \pm 0/10^a$	$18/20 \pm 3/30^c$	$40/50 \pm 5/10^c$	$43/10 \pm 4/50^c$	$10/30 \pm 0/25^c$
خانگی غیر آلوده	$1/10 \pm 0/05^a$	$17/60 \pm 4/21^c$	$38/30 \pm 4/63^c$	$44/60 \pm 3/80^c$	$9/30 \pm 2/21^c$
گله غیر آلوده	$1/10 \pm 0/05^a$	$15/90 \pm 3/75^c$	$39/40 \pm 4/51^c$	$45/60 \pm 5/15^c$	$10/70 \pm 1/32^c$
ولگرد آلوده	$0/20 \pm 0/07^c$	$28/70 \pm 3/27^a$	$69/20 \pm 4/55^a$	$88/30 \pm 4/30^a$	$18/30 \pm 0/90^a$
خانگی آلوده	$0/40 \pm 0/06^b$	$22/70 \pm 1/46^b$	$53/30 \pm 3/60^b$	$61/30 \pm 3/25^b$	$15/70 \pm 1/55^b$
گله آلوده	$0/35 \pm 0/06^b$	$21/40 \pm 2/66^b$	$52/60 \pm 3/42^b$	$63/50 \pm 4/70^b$	$14/40 \pm 1/32^b$
سطح معنی‌داری	0/0001	0/0001	0/0001	0/0001	0/0001

حروف انگلیسی مختلف در هر ستون، اختلافات معنی‌دار را در هر ستون در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد.

## بحث

نتایج نشان می‌دهد که روش مولکولی از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است. نتایج این بخش همسو با نتایج مطالعات قبل است که نشان دادند روش مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بیشتری در مقایسه با روش الایزا برخوردار بود (۱۸). نتایج یک مطالعه در غرب چین روی سگ‌های آلوده با لیشمانیوز انجام شده بود، نشان داد که روش مولکولی از حساسیت بیشتری در مقایسه با روش الایزا برخوردار بود (۳۷). در مطالعه‌ای

روش میکروسکوپی ۱۲/۷۱ درصد، بخش سرولوژیکی ۱۶/۱۰ درصد نمونه‌ها را به‌عنوان نمونه مثبت تشخیص داد، در حالی که روش مولکولی ۲۲/۸۸ درصد را به‌عنوان نمونه مثبت تشخیص داد. در یک مطالعه که در کاشان انجام شده بود، شیوع ۲۱ درصدی برای آلودگی با لیشمانیوز را با استفاده از روش‌های مولکولی بررسی کردند که نزدیک به نتایج این مطالعه است (۳۳). این

شرایط بیماری، ظرفیت آنتی اکسیدانی را کاهش می‌دهد (۱۲، ۵). دیگر مطالعات نشان دادند که متابولیت‌های واکنشگر اکسیژن در سگ‌های عفونی با لیشمانیوز بزرگ‌تر است (۲۲). نتایج این مطالعه همسو با مطالعات قبلی است که نشان دادند لیشمانیوز باعث تنش اکسیداتیو در بدن می‌شود و ارتباط مثبتی بین لیشمانیوز و تنش اکسیداتیو را گزارش کردند (۳). بزرگ بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی همسو با کاهش مالون دی‌آلدئید است. این نتایج نشان می‌دهد که بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی، میزان مالون دی‌آلدئید را کاهش می‌دهد. در این مطالعه، سگ‌های ولگرد وضعیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی در مقایسه با دیگر سگ‌ها نشان دادند که احتمالاً مربوط به وضعیت تغذیه‌ای این سگ‌ها می‌باشد. سگ‌های گله و خانگی توسط صاحبانشان حمایت می‌شوند و وضعیت تغذیه‌ای بهتری دارند. زمانی که یک حیوان وضعیت آنتی‌اکسیدانی بهتری دارد، می‌تواند با برخی از بیماری‌ها و عفونت‌ها بهتر مبارزه کند و نتایج این مطالعه این موضوع را به خوبی نشان می‌دهد.

سگ‌های آلوده، غلظت‌های سرمی بزرگ‌تری را برای فاکتورهای التهابی در مقایسه با سگ‌های غیر آلوده نشان دادند. این نتایج همسو با نتایج مطالعات قبلی است که نشان دادند سگ‌های آلوده با لیشمانیوز، غلظت بزرگ‌تری از انترفرون گاما داشتند (۳۲). انترفرون گاما و فاکتور نکروز تومور آلفا، سیتوکین‌های پیش التهابی هستند که در ایمونوپاتولوژی لیشمانیوز دخالت می‌کنند. انترفرون-گاما برای کنترل کردن پاتوژن‌های داخل سلولی و سلول‌های توموری ضروری است، ولی تولید بیش از حد این سیتوکین باعث ایجاد بیماری‌ها خود ایمن می‌شود (۲۹). فاکتور نکروز تومور آلفا عمدتاً توسط ماکروفاژها تولید می‌شود و باعث افزایش

دیگر نیز نشان داده شد که روش مولکولی از حساسیت و اختصاصیت بیشتری در مقایسه با روش الایزا برخوردار بود (۱۹)، که همسو با نتایج این مطالعه است. در مطالعه‌ای به بررسی شیوع لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها با استفاده از روش‌های *real-time polymerase chain reaction* و الایزا پرداخته شد (۲۰). نتایج این مطالعه، اختلاف معنی‌داری را بین روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الایزا نشان نداد، که در توافق با یافته‌های این مطالعه نیست. روش‌های مورد استفاده و دقت برای انجام آزمایش‌ها از عوامل تأثیرگذار در این زمینه است. در مطالعه‌ای به مرور تشخیص لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها با استفاده از مطالعات پیشین پرداخته شد (۸). در این مطالعه از ۱۴۰ نمونه‌ی مورد ارزیابی، ۴۱/۴۰ درصد نمونه توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تشخیص یافتند و ۱۷/۸۰ درصد از نمونه‌ها توسط روش الایزا تشخیص یافتند. نتایج این مطالعه توافق متوسطی بین این دو روش نشان داد، که همسو با نتایج این مطالعه است. در مطالعه‌ای نسبتاً مشابه، محققین نشان دادند که میزان تشخیص توسط روش الایزا ۳۶/۷۹ درصد و برای روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۱/۸۸ درصد بود (۳۷). اگرچه درصد‌های به دست آمده در این مطالعه و مطالعات پیشین متفاوت است ولی بر دقت بیشتر روش مولکولی تأکید دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که در سگ‌های ولگرد بیشتر از دیگر سگ‌ها بود. نتایج این مطالعه همسو با نتایج این مطالعات قبلی است که شیوع بسیار پایینی برای سگ‌های صاحب‌دار گزارش کردند (۱۱).

نتایج نشان داد که وضعیت آنتی‌اکسیدانی در سگ‌های آلوده در مقایسه با سگ‌های غیر آلوده به طور قابل توجهی ضعیف‌تر بود. مشابه به نتایج این مطالعه، دیگر مطالعات گزارش کرده‌اند که تنش اکسیداتیو و

### منابع

1. Albuquerque, A., Campino, L., Cardoso, L., Cortes, S. (2017). Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasite Vectors*, **13**:47-57
2. Alexandre, J., Sadlova, J., Lestinova, T., Vojtkova, B., Jancarova, M., Podesvova, L., Yurchenko, V., Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., Volf, P. (2020). Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*, **10**: 35-66.
3. Almeida, B.F.M., Narciso, L.G., Melo, L.M., Preve, P.P., Bosco, A.M., Lima, V.M.F., Ciarlina, P.C. (2013). Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *The Veterinary Journal*, **198**: 23-30.
4. Badirzadeh, A., Heidari-Kharaji, M., Fallah-Omrani, V., Dabiri, H., Araghi, A., Chirani, A. (2020). Antileishmanial activity of *Urtica dioica* extract against zoonotic cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Tropical Disease*, **14**: e0007843.
5. Bildik, A., Kargin, F., Seyrek, K., Pasa, S., Ozensoy, S. (2004). Oxidative stress and nonenzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, **77**: 63–66.
6. Boon Ong, H., Clare, S., Jonathan Roberts, A., Elizabeth Wilson, M., James Wright, G. (2020). Establishment, optimisation and quantitation of a bioluminescent murine infection model of visceral leishmaniasis for systematic vaccine screening. *Scientific Reports*, **10**: 4689.
7. de Almeida, M.E., Spann, D.R., Bradbury, R.S. (2020). *Leishmania infantum* in US-Born dog. *Emerging Infectious Diseases*, **26**: 1882-1884.

فعالیت ماکروفاژها و سنتز نیتریک اکسید می شود (۱۶). مشابه به نتایج این مطالعه، دیگر مطالعات گزارش کردند که بیماران با علائم این بیماری، غلظت‌های بزرگ تری از انترفرون-گاما و فاکتور نکروز تومور آلفا را دارند (۱۴). اینترلوکین-۱ بتا تولید سلول‌های T تولید کننده انترفرون گاما را حمایت می کند و باعث افزایش تولید ایمونوگلوبین G2a می شود (۲۳). این فاکتور، بیماری را در بدن توسط افزایش دادن تولید فاکتور نکروز تومور آلفا ترغیب می کند (۱۳). افزایش غلظت سیتوکین‌های التهابی نوعی پاسخ به آلودگی است. در این مطالعه، سگ‌های آلوده، پاسخ‌های التهابی را توسط افزایش دادن غلظت سیتوکین‌ها نشان می دهند. افزایش غلظت در سگ‌های ولگرد، ممکن است به علت ایمنی ضعیف تر و درگیر بودن با دیگر بیماری‌ها باشد.

### نتیجه گیری

در مجموع، روش‌های ملکولی، روش‌های مناسبی برای تشخیص لیشمانیوز هستند و سگ‌های ولگرد بیشتر در معرض این بیماری هستند. سگ‌های ولگرد آلوده، سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیف تری دارند و دارای پاسخ‌های التهابی بزرگ تری هستند. در نظر گرفتن فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی برای کمک به سگ‌ها برای کمتر در معرض بیماری قرار گرفتن کمک می کند.

### تقدیر و تشکر

از تمامی عزیزانی که در اجرای این کار کمک نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.



- braziliensis* infection. *Clinical Infection Disease*, **34**:e54–e8.
15. Kanyina, E.W. (2020). Characterization of visceral leishmaniasis outbreak, Marsabit County, Kenya, 2014. *Kanyina BMC Public Health*, **2**: 4446-4454.
  16. Liew, F.Y., Wei, X.Q. (1997). Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Biological Science*, **352**:1311–15.
  17. Martin-Sanchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sanchez, C., Baron, S., Diaz, V., Morillas-Marquez, F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, **15**:795–798.
  18. Maurelli, M.P., Bosco, A., Manzillo, V.F., Vitale, F. (2020). Clinical, molecular and serological diagnosis of canine leishmaniosis: An integrated approach. *Veterinary Science*, **7**:43-53.
  19. Maia, C., Cristóvão, J., Pereira, A. (2020). Monitoring *Leishmania* infection and exposure to *Phlebotomus perniciosus* using minimal and non-invasive canine samples. *Parasites Vectors*, **13**:119-125.
  20. Monteiro, F.M., Machado, A.S., Rocha-Silva, F., Assunção, C.B., Graciele-Melo, C., Costa, L.E., Portela, A.S., Ferraz Coelho, E.A., Maria de Figueiredo, S., Caligiorne, R.B. (2019). Canine visceral leishmaniasis: Detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). *Microbiology Pathogens*, **126**:263-268.
  21. Montoya, A., Glvez, R., Checa, R., Sarquis, J., Plaza, A., Barrera, J.P., Marino, V., Mir, G. (2020). Latest trends in *L. infantum* infection in dogs in Spain, Part II: current clinical management and control according to a national survey of veterinary practitioners. *Parasites Vectors*, **13**: 205-215.
  8. De Carvalho, F., Riboldi, E., Bello, G., Ramos, R., Barcellos, R., Gehlen, M., Rossetti, M. (2018). Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection*, **146**: 571-576.
  9. Di Pietro, S., Crinò, C., Falcone, A., Crupi, R., Francaviglia, F., Vitale, F., Giudice, E. (2020). Parasitemia and its daily variation in canine leishmaniasis. *Parasitology Research*, **119**: 3541–3548.
  10. Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, **37**: 277–285.
  11. Haddadzade, H.R., Fattahi, R., Mohebbali, M., Akhoundi, B., Ebrahimzade, E. (2013). Seroepidemiological investigation of visceral leishmaniasis in stray and owned dogs in Alborz province, central Iran using direct agglutination test. *Iranian Journal of Parasitology*, **8**:152-157.
  12. Heidarpour, M., Soltani, S., Mohri, M., Khoshnegah, J. (2012). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology Research*, **111**: 1491–1496.
  13. Ikejima, T., Okusawa, S., Ghezzi, P., Van der Meer, J.W., Dinarello, C.A. (1990). Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF like activity in rabbits. *Journal of Infected Disease*, **162**:215–23.
  14. Ivonise, F., Cibele, A., Olívia, B., Clarissa, B.A., Lucas, P.C. and Roque, P.A. (2009). Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania*

- responses. *Advanced Immunology*, **96**:41–101.
30. Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Petersen, C., Bourdeau, P., Oliva, G., Miro, G., Ferrer, L., Baneth, G. (2017). Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. *Trends in Parasitology*, **33**: 706–717.
  31. Sosa, N., Pascale, J.M., Jimenez, A.I., Norwood, J.A., Kreishman-Detrick, M., Weina, P.J. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Negl Tropical Disease*, **13**: e0007253.
  32. Strauss-Ayali, D., Baneth, G., & Jaffe, C. L. (2007). Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, **38**: 547-564.
  33. Taslimian, R., Shemshadi, B., Spotin, A., Fotouhi Ardakani, R., Parvizi, P. (2020). Molecular characterization of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs in North Khorasan, Northeastern Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **12**: e100078.
  34. Thakur, S., Joshi, J., Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasite Disease*, **44**: 253-272.
  35. Travi, B.L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., Miro, G., (2018). Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Tropical Disease*, **12**: e0006082.
  36. Wanasen, N., Soong, L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunological Research*, **41**: 15–25.
  37. Wang, J., Ha, Y., Gao, C., Wang, Y., Yang, Y., Chen, H. (2011). The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. *Parasites & Vectors*, **4**:69-78.
  22. Paltrinieri, S., Ravicini, S., Rossi, G., Roura, X. (2010). Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, **186**: 393–395.
  23. Pape, K.A., Khoruts, A., Mondino, A., Jenkins, M.K. (1997). Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, **159**: 591–598.
  24. Passarella Teixeira, A.I., Silva, D.M., Santana de Freitas, L.R., Sierra Romero, G.A. (2020). A cross-sectional approach including dog owner characteristics as predictors of visceral leishmaniasis infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **115**: e190349.
  25. Ramírez, L., de Moura, L.D., Fontoura Mateus, N.L., de Moraes, M.H. (2020). Improving the serodiagnosis of canine *Leishmania infantum* infection in geographical areas of Brazil with different disease prevalence. *Parasite Epidemiology and Control*, **8**: e00126.
  26. Rassi, Y., Kaverizadeh, F., Javadian, E. (2004). First report on natural promastigote infection of *Phlebotomus caucasicus* in a new focus of visceral leishmaniasis in North West of Iran. *Iranian Journal of Public Health* **33**:70-72.
  27. Rezaei, Z., Azarang, E., Shahabi, S., Omidian, M., Pourabbas, B., Sarkari, B. (2020). *Leishmania* ITS1 Is genetically divergent in asymptomatic and symptomatic visceral leishmaniasis: results of a study in southern Iran. *Journal of Tropical Medicine* **4**: 5351098.
  28. Sacks, D., Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Natural Review Immunology*, **2**: 845–858.
  29. Schoenborn, J.R., Wilson, C.B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune