مقاله پژوهشی

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

شناسایی شیوع بالای *لیشمانیا اینفانتوم* در سگ های ولگرد بدون علامت شیراز با تکنیک Semi Nested PCR

حمید رضا سلطانی[۱]، علی کریمی[۲*]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۲]گروه انگل شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۵ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: *لیشمانیا اینفانتوم* عامل بیماری لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) می باشد. این تک یاخته اهمیت زئونوتیک داشته و در سگ ها و انسان ایجاد بیماری می کند. کشور ما یکی از کانون های عمده بیماری لیشمانیوز می باشد به طوری که لیشمانیوز احشایی و لیشمانیوز پوستی در اغلب مناطق کشور گزارش شده است. استان فارس و شهرستان شیراز یکی از کانون های بیماری لیشمانیوز (جلدی و احشایی) محسوب می شود. لذا این مطالعه با هدف شناسایی *لیشمانیا اینفانتوم* در سگ های ولگرد بدون علامت در شهرستان شیراز با تکنیک Semi Nested PCR انجام گردید.

مواد و روش‌ها: روش های روتین شناسایی انگل لیشمانیا توسط تکنیک انگل شناسی صورت می گیرد که بر مبنای مشاهده ریزبینی انگل در بافت های آلوده می باشد. از معایب عمده روش مذکور این است که قادر به تشخیص گونه انگل نمی باشد. لذا در مطالعه حاضر از روش مولکولی Semi Nested PCR استفاده گردید. در این بررسی تعداد ۱۰۰ قلاده سگ ولگرد فاقد علامت بیماری لیشمانیوز به صورت تصادفی از مناطق مختلف شهرستان شیراز انتخاب گردید و از خون مرکزی آن ها نمونه گیری شد. نمونه ها تحت آزمایش تشخیص مولکولی فوق قرار گرفتند.

یافته‌ها: تعداد ۳۵ نمونه (۳۵٪) از نظر آلودگی به *لیشمانیا اینفانتوم* مثبت شناسایی شدند. تمامی سگ های لیشمانیوز مثبت فاقد علائم بالینی بیماری بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه سگ های لیشمانیوز مثبت هیچ گونه علائم بالینی واضح بیماری نداشتند لذا رعایت تمامی نکات کنترل و پیشگیری از بیماری اعم از کنترل سگ های ولگرد و پشه های خاکی ناقل، آموزش به آحاد جامعه و رعایت بهداشت فردی و عمومی مورد تاکید است. با عنایت به آسانی، سرعت و دقت بالای تکنیک استفاده شده در مطالعه حاضر پیشنهاد می شود.

واژه‌های کلیدی: *لیشمانیا اینفانتوم*، *Semi Nested PCR*، سگ، شیراز

حمید رضا سلطانی، علی کریمی. شناسایی شیوع بالای *لیشمانیا اینفانتوم* در سگ های ولگرد بدون علامت شیراز با تکنیک Semi Nested PCR. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۱؛ ۵(۱۳): ۷۴۸-۷۵۷.

* نویسنده مسئول: گروه انگل شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

Orcid: https://orcid.org/ 0000-0002-8773-8782 ، Email: alikarimi224@yahoo.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

مقدمه

لیشمانیوزها بیماری های مشترک بین انسان و حیوان می باشند که به اشکال پوستی، مخاطی و پوستی-مخاطی مشاهده می شوند. این بیماری ها گسترش جهانی داشته و به خصوص در مناطق گرمسیری دارای اهمیت فراوانی هستند. مطابق گزارش سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization, 2012) لیشمانیوز جلدی در ۸۷ کشور جهان به صورت بومی وجود دارد و سالانه نیم تا یک میلیون نفر به این بیماری انگلی مبتلا می شوند. لیشمانیوز در اغلب استان های کشور گزارش شده است (Akhavan *et al.,* 2006; Moin-Vaziri *et al.,* 2007; Minodier & Parola, 2007). مخزن اصلی بیماری لیشمانیوز سگ و سگ سانان می باشد و ناقل آن پشه های خاکی جنس فلبوتوموس می باشد. همانطور که گفته شد بیماری لیشمانیوز پوستی و احشایی (کالاآزار) در اغلب مناطق کشور وجود دارد از جمله کانون های مهم بیماری که بصورت بومی وجود دارد استان های فارس، بوشهر، قم، آذربایجان شرقی و اردبیل می باشد (Akhavan *et al.,* 2006; Moin-Vaziri *et al.,* 2007).

روش تشخیص متداول لیشمانیوز توسط نمونه برداری از زخم های پوستی و غدد لنفاوی و مغز استخوان و رنگ آمیزی با گیمسا و بررسی ریزبینی گسترش های رنگ شده صورت می گیرد. به دلیل شباهت های ریخت شناسی روش مذکور قادر به شناسایی گونه های انگل نمی باشد (Tai *et al.,* 2000). تعیین گونه و حتی سویه انگل در تشخیص، کنترل، پیشگیری و درمان بیماری لیشمانیوز لازم و ضروری است. لذا جهت تشخیص این انگل ها از روش های مختلفی از جمله روش های مولکولی استفاده می شود. از مزایای روش های مولکولی حساسیت و ویژگی بالای تشخیصی است همچنین می توان از آن جهت تعیین هویت انگل در لام های رنگ آمیزی شده نیز استفاده کرد (Singh, 2000; Baker & Alvar, 2002). تکنیک PCR-RFLP به عنوان روشی دقیق در شناسایی گونه های عامل لیشمانیوز جلدی توسط محقیقین مورد استفاده قرار گرفته است (Jirkù *et al.,* 2006; Spanakos *et al.,* 2008; Marfurt *et al.,* 2003). حلقه های کوچک DNA کینتوپلاستی به عنوان ژن حفاظت شده در گونه های لیشمانیا تایید شده است زیرا در ۱۰۰۰۰ کپی از هر سلول حضور دارند و ترادف نوکلئوتیدی آنها برای اکثر گونه های لیشمانیا (بخصوص *لیشمانیا تروپیکا*، *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا اینفانتوم*) مشخص شده است و می توان از آن توسط روش Semi Nested PCR در تشخیص گونه های عامل لیشمانیوز جلدی و احشایی بهره برد (Aransay *et al.,* 2000). لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه عامل لیشمانیوز احشایی (*لیشمانیا اینفانتوم*) در سگ های شهرستان شیراز توسط روش Semi Nested PCR ژن kDNA (DNA کینتوپلاست) انجام گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع مقطعی بود. نمونه‌گیری از ۱۰۰ قلاده سگ ولگرد فاقد علامت بیماری در شهرستان شیراز (مرکزی و روستاهای اطراف) صورت گرفت. توسط سرنگ و سوزن استریل از ورید سفالیک هر سگ ۵ سی‌سی خون گرفته و در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA ۰/۲ دهم سی‌سی) نگهداری گردیدند. نمونه های خون ظرف مدت زمان کمتر از ده ساعت به آزمایشگاه منتقل شد و تحت سانتریفوژ با دور 800g به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند تا لایه بافی‌کوت از سرم جدا شد. لایه بافی‌کوت برداشته و تا زمان استخراج DNA در

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری FAVORGEN DNA extraction Kit (MBST, Iran) مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام گرفت. که به طور خلاصه شامل مراحل ذیل بود:

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه را با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (MBST, Iran) و بافر لیز کننده FABG (MBST, Iran) توسط ورتکس به خوبی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس محلول را چندین بار با بافر شستشوی FABG (MBST, Iran) شستشو داده و توسط بافر الوشن (Elution) (MBST, Iran) استخراج DNA تمام گردید. جهت تکثیر قطعات محافظت شده ژن kDNA از پرایمرهای LINR4 (رو به جلو)، LIN17 (رو به عقب دور اول PCR) و LIN19 (رو به عقب دور دوم PCR) (سیناژن، ایران) استفاده گردید (Aransay *et al.*, 2000).

نام پرایمر	توالی ژن	گونه انگل	طول محصول
LINR4	5'-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3'	L.infantum	۷۲۰
LIN17	5'-TTTGAACGGGATTTCTG -3'	L.infantum	۷۲۰
LIN19	5'-CAGAACGCCCCTACCCG -3'	L.infantum	۷۲۰

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

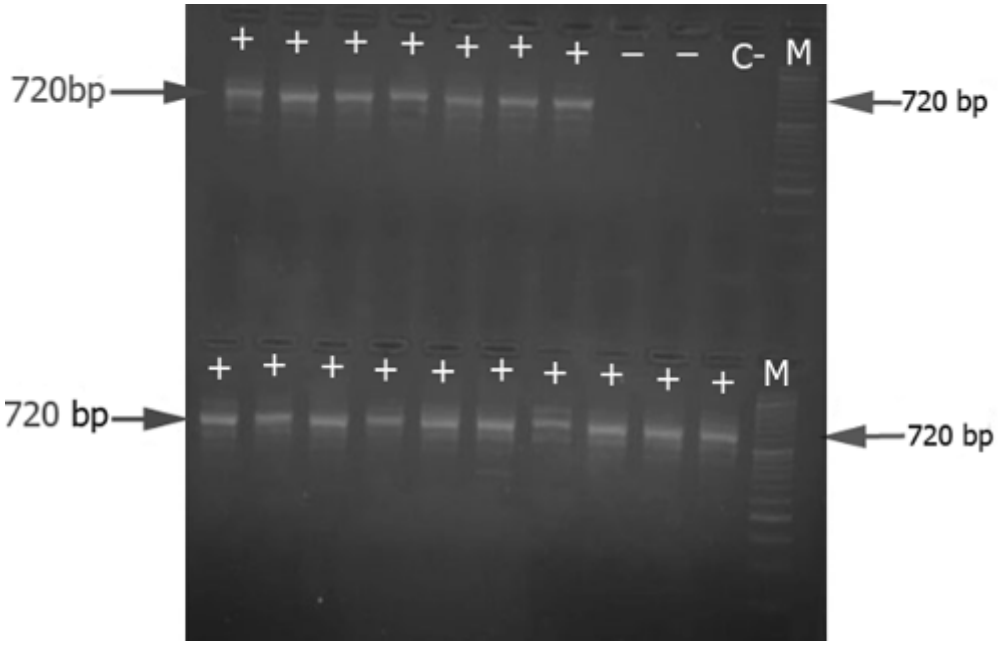
همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود قطعه ژنی تکثیر شده *لیشمانیا اینفانتوم* ۷۲۰ زوج باز طول دارد. مرحله اول PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده نمونه،۲۵۰ میکرو مول از هر یک از dNTPs (دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات)، یک و نیم میلی مول MgCl2، ۱ واحد DNA پلیمراز تک (سیناژن، تهران)، یک میکرومول پرایمر LINR4، یک میکرومول LIN17 در بافر یک بار تهیه شد. محلول PCR مذکور توسط دستگاه چرخه ساز حرارتی تحت تکثیر DNA در مرحله اول قرار گرفتند. برنامه حرارتی این مرحله شامل: یک چرخه واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه به ترتیب ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه (گسترش) و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. دومین دور PCR به حجم ۴۰ میکرولیتر حاوی ۴ میکرولیتر محصول PCR مرحله قبل،۲۵۰ میکرو مول از هر یک از dNTPs (دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات)، یک و نیم میلی مول MgCl2، ۱ واحد DNA پلیمراز تک (سیناژن، تهران)، یک میکرومول پرایمر LINR4، یک میکرومول LIN19 در بافر یک بار تهیه شد. محلول PCR مذکور توسط دستگاه چرخه ساز حرارتی تحت تکثیر DNA در مرحله دوم قرار گرفت. برنامه حرارتی این مرحله شامل: ۳۳ چرخه به ترتیب ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه (گسترش) و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه (گسترش نهایی) انجام گردید. محصولات PCR روی ژل آگارز یک و نیم درصد در بافر نیم بار تری- بورات- اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) الکتروفورز شده و سپس رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آشکارسازی باندهای

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

DNA تحت اشعه فرابنفش توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور صورت پذیرفت. باند حاصل از *لیشمانیا اینفانتوم* ۷۲۰ زوج باز طول دارد.

نتایج

تعداد ۱۰۰ قلاده سگ ولگرد از نواحی مختلف شیراز و حومه نمونه گیری به عمل آمد. سگ های تحت نمونه برداری از کوچه و خیابان های شیراز و همچنین اطراف شیراز (جاده صدرا، شهرک گلستان، روستای قلات، روستای بیدزرد و اطراف دریاچه نمک) بودند. قبل از خونگیری سگ ها تحت معاینه بالینی ظاهری قرار گرفتند. هیچ یک از سگ ها علائم بیماری لیشمانیوز (زخم های پوستی، تب، کم خونی و لنفادنوپاتی) نداشتند. البته هشت قلاده از سگ ها علائم بیماری دیستمپر داشتند که ممکن است به دلیل ضعف سیستم ایمنی ناشی از بیماری لیشمانیوز احشایی بوده باشد زیرا سگ های مذکور (سگ های مبتلا به دیستمپر) همگی با آزمایش مولکولی Semi Nested PCR از نظر لیشمانیوز احشایی (ناشی از انگل *لیشمانیا اینفانتوم*) مثبت بودند. پس از معاینات بالینی مذکور اقدام به خونگیری از ورید سفلیک و تهیه بافی کوت از آنها شد. از بافی کوت های تهیه شده گسترش رنگ آمیزی شده با گیمسا تهیه گردید و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰ (هزار برابر) بررسی شدند. در هیچ یک از گسترش های مذکور نمونه انگلی لیشمانیا مشاهده نشد. سپس اقدام به تشخیص مولکولی گردید. از ۱۰۰ قلاده سگ تحت بررسی ۳۵ سگ آلوده به تک یاخته *لیشمانیا اینفانتوم* تشخیص داده شدند که در شکل ۱ نتیجه Semi Nested PCR آنها آمده است.



شکل ۱. الگوی باند های حاصل از Semi Nested PCR بر روی نمونه های خون سگان شیراز. M : مارکر ۵۰ زوج باز. 720 bp : ۷۲۰ زوج باز (طول قطعه DNA ی تکثیر شده *لیشمانیا اینفانتوم*). C- : کنترل منفی (به جای DNA آب مقطر استفاده شد). + : نمونه های *لیشمانیا اینفانتوم* مثبت. – : نمونه های *لیشمانیا اینفانتوم* منفی.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

بحث

در کشور ما سگ ها مهمترین مخازن بیماری لیشمانیوز احشایی محسوب می شوند (Khanmohammadi *et al.,* 2010). این بیماری قابل انتقال به انسان بوده و می تواند حتی باعث مرگ بشود. یکی از عوامل اصلی لیشمانیوز احشایی تک یاخته *لیشمانیا اینفانتوم* می باشد که در بیش از ۷۰ کشور جهان گسترده شده است. ناقل این بیماری در کشور ما و بسیاری از کشورهای دیگر پشه های خاکی جنس فلبوتوموس می باشد. تشخیص مولکولی انگل ها بر پایه تکثیر DNA یک تکنیک عالی و دقیق محسوب می شود که در تشخیص انگل ها توسط بسیاری از محققین در ایران و سایر کشورها استفاده شده است از جمله در شناسایی تک یاخته های لیشمانیا در میزبان های اصلی، مخازن و میزبان های ناقل که با حساسیت بالا تشخیص داده شده اند (Kato *et al.,* 2005; Rassi *et al.,* 2005; Azizi *et al.,* 2006; Lachaud *et al.,* 2002).

در تحقیق حاضر جهت تشخیص *لیشمانیا اینفانتوم* توسط روش Semi Nested PCR از سه پرایمر LINR4 ، LIN17 و LIN19 استفاده شد که به آسانی ، سرعت و دقت بالا شناسایی انگل مذکور صورت پذیرفت. پرایمرهای مذکور قبلا توسط Aransay و همکاران به منظور شناسایی تک یاخته های لیشمانیا در پشه های خاکی در کشور یونان مورد استفاده قرار گرفته بود (Aransay *et al.,* 2000). Edrissian و همکاران شیوع سرمی لیشمانیا در مخازن بیماری را بررسی کردند که نتایج آن ها بسیار کمتر از نتایج تحقیق حاضر می باشد. لازم به یادآوری است که تکنیک مولکولی PCR یک تکنیک طلایی در تشخیص های انگلی محسوب می شود (Edrissian *et al.,* 1993). همچنین نتایج شیوع آلودگی توسط تکنیک سرم شناسی گزارش شده از Mohebali و همکاران در استان بوشهر کمتر از نتایج این تحقیق بوده است (Mohebali *et al.,* 2001).

Rassi و همکاران در مطالعه ای در نورآباد ممسنی نقش سگهای بدون علامت به عنوان مخزن *لیشمانیا اینفانتوم* را مشخص و میزان شیوع عفونت را تعیین کردند. به این منظور از ۲۰ قلاده سگ ولگرد و گله بدون علامت به صورت اتفاقی نمونه گیری شد. روی لایه بافی کوت خون محیطی استخراج DNA و PCR انجام شد. روش Semi-nested PCR با استفاده از پرایمرهای LIN17، LINR4 و LIN19 انجام شد. از ۲۰ نمونه اخذ شده ۶ تا (۲۰ درصد) مثبت شد. بنابراین سگ ها حتی اگر بدون علامت باشند، به عنوان مخزن این بیماری در نظر گرفته می شوند (Rassi *et al.,* 2007). Moshfe و همکاران شیوع سرمی لیشمانیوز احشایی سگ سانان را در ناحیه مشکین شهر با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم ۱۷/۴ درصد گزارش کردند (Moshfe *et al.,* 2009). Farzam و همکاران برای تعیین لیشمانیوز احشایی در سگ های گله ناحیه جهرم در جنوب استان فارس، ۴۱۳ نمونه ی سرم به طور اتفاقی جمع آوری کردند. نمونه ها با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم تست و شیوع سرمی بیماری ۷/۶ درصد گزارش شد. ارتباطی بین سن و جنس و آلودگی وجود نداشت (Farzam *et al.,* 2008). Moshfe و همکاران از ۷۱ نمونه خون از سگهای ۵ روستای اندمیک در ناحیه مشکین شهر تهیه و از نظر شیوع لیشمانیوز احشایی با استفاده از روشهای آگلوتیناسیون مستقیم، PCR و Dipstick rk39 مورد آزمایش قرار دادند. شیوع سرمی با استفاده از آگلوتیناسیون مستقیم ۲۳/۹٪ و با Dipstick rk39 ۳۱٪ و با PCR پوست ۲۹/۶٪ و PCR خون ۴۳/۷٪

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

گزارش شد (Moshfe *et al.*, 2009). Fakhar و همکاران در بر روی مخازن حیوانی (سگ) تعداد ۳۲ قلاده سگ با روش آگلوتیناسیون مستقیم و PCR ارزیابی شدند. ۷ مورد از نظر سرولوژی مثبت بودند و تنها دو مورد از آنها علائم بالینی داشتند و بقیه موارد مثبت فاقد علائم بالینی بودند. بیشترین میزان شیوع سرمی ۶۲/۵٪ در سگ های گروه سنی ۵- ۱ سال بود و از نظر جنس اختلاف معناداری بین دو جنس دیده نشد. با روش PCR خون ۵ مورد مثبت شد که ۳ مورد آن سرولوژی مثبت بودند (Fakhar *et al.*, 2010). شیوع کالاآزار در سگ های سراب استان آذربایجان شرقی توسط روش PCR ژن DNA کینتوپلاستی ۱۱/۸ درصد گزارش شد (Fallah *et al.*, 2010). در تحقیق Fakhar و همکاران توسط روش های سرولوژی و مولکولی پی سی آر میزان شیوع لیشمانیوز احشایی بترتیب تکنیک های آزمایشی فوق ۵/۵ و ۲۳ درصد برآورد شد و اختلاف معناداری بین جنس و شیوع آلودگی وجود نداشته است. همچنین روش پی سی آر را دقیق تر از روش سرولوژی گزارش کرده اند (Fakhar *et al.*, 2011).

یکی از دست آوردهای مهم تحقیق حاضر شیوع بسیار بالای *لیشمانیا اینفانتوم* در سگ های بدون صاحبی بوده است که علائم بیماری لیشمانیوز نداشتند که این موضوع اهمیت اپیدمیولوژیک بیماری و انتقال بیماری به انسان را حائز اهمیت دوچندانی می کند چرا که ارتباط مثبت مستقیمی بین شیوع انگل در سگ و انسان وجود دارد (Mazloumi Gavgani *et al.*, 2002). یکی دیگر از دست آوردهای مهم و جالب تحقیق حاضر نمونه گیری از خون و استخراج DNAی انگل از لایه بافی کوت خون می باشد که بسیار آسان بوده و نسبت به نمونه برداری های روتین که از مغز استخوان و طحال صورت می پذیرد به مراتب ایمن تر می باشد.

نتیجه گیری

محققین این بررسی از شیوع بسیار بالای لیشمانیوز احشایی در سگ های ولگرد شیراز متعجب شدند زیرا سگ های تحت بررسی همان هایی هستند که آزادانه در گوشه و کنار شهرستان و در کنار منازل و ادارات شهر پرسه می زنند غافل از اینکه آن ها مخازن بیماری خطرناک لیشمانیوز احشایی می باشند که اهمیت زئونوتیک دارند. نکته حایز اهمیت این بود که سگ های لیشمانیوز مثبت هیچ گونه علائم بالینی واضح بیماری نداشتند. لذا رعایت تمامی نکات کنترل و پیشگیری از بیماری اعم از کنترل سگ های ولگرد و پشه های خاکی ناقل، آموزش به آحاد جامعه و رعایت بهداشت فردی و عمومی مورد تاکید است. با عنایت به آسانی، سرعت و دقت بالای تکنیک استفاده شده در مطالعه حاضر پیشنهاد می شود که این تحقیق ادامه پیدا کند و بررسی های دقیق و کاملی بر روی سایر میزبان ها ازقبیل موش و پشه خاکی نیز به عمل آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

References

Akhavan AA., Yaghoobi-Ershadi MR., Hasibi F., Jafari R., Abdoli H., Arandian MH., et al. Epidemiological survey in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Southern Iran. In: Proceeding of 11th International Congress of Parasitology (ICOPA), Glasgow Scotland, 2006.

Aransay AM., Scoulica E. and Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sandflies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplast DNA. Applied Environ Microbiol, 2000; 66: 1933-1938.

Azizi K., Rassi Y., Javadian E., Motazedian MH., Rafizadeh S., Yaghoobi Ershadi MR., et al. Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri: a probable vector of Leishmania infantum in Iran. Ann Trop Med Parasitol, 2006; 100(1): 63-68.

Baker JR. and Alvar J. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases: RSTMH, 2002; 96: 1-250.

Edrissian GH., Ahanchin AR. and Gharachahi AM. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. Iranian J Med Sci, 1993; 18: 99-105

Farzam M., Changizi E., Mohebali M., Akhoundi B. and Salimi BM. Seroepidemiological Survey Of Canine Visceral Leishmaniasis In Jahrom City, Fars Province. Scientific Research Irainian Veterinary Journal, 2008; 4(3): 58-67.

Fakhar M., Motazedian M., Asgari Q., Kalan-tari M., Hatam G., Akbarpoor M., et al. The efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog. J Jahrom Univ Med Sci, 2010; 8(2): 1-7.

Fakhar M., Motazedian MH., Asgari Q. and Kalantari M. Asymptomatic domestic dogs are carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs host for human visceral leishmaniasis in southern Iran. Comp Clin Path, 2011; 21(5): 801-7.

Fallah E., Khanmohammadi M., Rahbari S., Farshchian M., Farajnia S., Hamzavi F., et al. Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. Afr J Biotechnol, 2010; 10(4): 648-56.

Jirkù M., Zemanová E., Al-Jawabreh A., Schönian G. and Lukes J. Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of Leishmania tropica. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006; 55(1): 75-9.

Kato H., Uezato H., Katakura K., Marco M., Barroso J., Gomez P., et al. Detection and identification of Leishmania species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 2005; 72(1): 87-93.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

Khanmohammadi M., Falah E. and Rahbari S. Serprevalance study of visercal leishmania in owned dogs with ELISA and indirect immunoflurescencce tests in Sarab city, East Azarbyjan. J Vet Med, 2010; 4: 31-39

Lachaud L., Marchergui-Hammami S., Chabbert E., Dereure J., Dedet J. and Bastien P. Comparison of six methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clinic Microbiol, 2002; 40(1): 210-215

Mazloumi Gavgani S., Mohite H., Edrissian GH., Mohebali M. and Davies C. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with Leishmania infantum. Am J Trop Med Hyg, 2002; 67(5): 511-515

Mohebali M., Hamzavi Y., Edrissian GH. and Forouzani A. Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in Bushehr province, Islamic republic of Iran. East Mediterr Health J, 2001; 7: 912-917

Moshfe A., Mohebali M., Edrissian G., Zarei Z., Akhoundi B., Kazemi B., et al. Seroepidemiological study on canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, Ardabil province, northwest of Iran during 2006-2007. Iran J Parasitol, 2008; 3(3): 1-10.

Moshfe A., Zarei Z., Akhoundi B., Edrissian G., Kazemi B., Jamshidi S., et al. Comparison between serology and PCR methods for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Armaghane Danesh, 2009; 14(2): 31-42.

Marfurt J., Nasereddin A., Niederwieser I., Jaffe CL., Beck HP. and Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis, J Clin Microbiol, 2003; 41(7): 3147-3153.

Minodier PH. and Parola PH. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis, 2007; 5(3): 150-158.

Moin-Vaziri V., Depaquit J., Yaghoobi-Ershadi MR., Oshaghi MA., Derakhshandeh-Rassi Y., Azizi K., et al. The seminested PCR based detection of Leishmania infantum infection in asymptomatic dogs in a new endemic focus of visceral leishmaniasis in Iran. J. Arthropod Borne Dis, 2007; 1(1): 38-42.

Rassi Y., Javadian E., Nadim A., Zahraii A., Vatandoost H., Motazedian MH., et al. Phlebotomus (Larroussius) kandelakii the principal and proven vector of visceral leishmaniasis in north west of Iran. Pak J Biol Sci, 2005; 8(12): 1802-1806.

Rassi Y., Azizi K., Motazedian M., Javadian E., Rafizadeh S., Fakhar M., et al. The seminested PCR based detection of leishmania infantum infection in asymptomatic dogs in a new endemic focus of visceral leishmaniasis in Iran. J Arthropod Borne Dis, 2007; 1(1): 38-42.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res, 2006; 123(3): 311.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

Spanakos G., Piperaki ET., Menounos PG., Tegos N., Flemetakis A. and Vakalis NC. Detection and species identification of Old World Leishmania in clinical samples using a PCR based method. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008; 102(1): 46-53.

Tai NOE., Osman OF., Fari ME., Presber W. and Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000; 94(5): 575-9.

World Health Organization (WHO), Manual for Case Management of Cutaneous Leishmaniasis in the WHO, Eastern Mediterranean Region, 2012.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

JOAVM
Journal of Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Research Article

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

Detecting the High Prevalence of *Leishmania Infantum* in Asymptomatic Stray Dogs of Shiraz by PCR Technique

Hamid Reza Soltani[1], Ali Karimi[2*]

[1]Graduate of DVM, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[2]Department of Parasitology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Received: 26/Dec/2021 Revised: 09/Feb/2022 Accepted: 14/Feb/2022

Abstract

Background and aim: *Leishmania infantum* is the cause of visceral leishmaniasis (Kalaazar). This protozoan has zoonotic importance and causes disease in dogs and humans. Our country is one of the major foci of leishmaniasis, such that visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis have been reported in most regions of the country. Fars province and Shiraz city are considered as the foci of leishmaniasis (cutaneous and visceral). Therefore, this study was conducted with the aim of identifying *Leishmania infantum* in asymptomatic stray dogs in Shiraz city using Semi Nested PCR technique.
Materials and Methods: Routine methods of Leishmania parasite identification are performed by parasitological technique, which is based on microscopic observation of the parasite in infected tissues. One of the main disadvantages of the mentioned method is that it is not able to detect the parasite species. Therefore, Semi Nested PCR molecular method was used in the present study. In this study, 100 stray dogs without leishmaniasis symptoms were randomly selected from different areas of Shiraz city and their central blood was sampled. The samples were subjected to the above molecular detection test.
Results: Thirty five samples (35%) were identified as positive for *Leishmania infantum* infection. All leishmaniasis positive dogs had no clinical signs of the disease.
Conclusion: Considering that leishmaniasis positive dogs did not have any clear clinical signs of the disease, therefore, all points of control and prevention of the disease, including the control of stray dogs and vector Phlebotomus, education to community members and compliance with personal and public health should be observed. Emphasis is considering the ease, speed and high accuracy of the technique used in the present study, it is suggested.

Keywords: *Leishmania infantum, Semi Nested PCR, Dog, Shiraz*

Cite this article as: Hamid Reza Soltani, Ali Karimi. Detecting the high prevalence of *Leishmania infantum* in asymptomatic stray dogs of Shiraz by PCR technique. J Altrn Vet Med. 2022; 5(13): 748-757.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.2.4]

**** Corresponding Author***
Department of Parasitology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
E-mail: alikarimi224@yahoo.com, Orcid: https://orcid.org/0000-0002-8773-8782