

التشخيص المصلي لداء الليشمانيا في الكلاب باستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم في محافظة نينوى

وسن أمجد أحمد العبيدي

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، موصل، العراق

(الاستلام ١٥ كانون الأول ٢٠١٨؛ القبول ٢٠ نيسان ٢٠١٩)

الخلاصة

تم خلال هذه الدراسة التقصي عن الأضداد النوعية لطفيلي الليشمانيا باستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر والمتخصص للكشف عن الأضداد النوعية والمتخصصة لمعقد طفيلي (*Leishmania donovani complex (L. infatum, L. chagasi)* في أمصال ٨٠ من الكلاب بنوعيهما ذات التربية المنزلية والسائبة وبمختلف الأعمار ولكلا الجنسين في محافظة نينوى للفترة الزمنية من ايار ٢٠١٨ ولغاية تشرين الأول ٢٠١٨، كان بعض الحيوانات يعاني من ظهور تقرحات جلدية في منطقة الوجه والأطراف مع حصول إسهال مدمم، تقيؤ، تشنجات مع تثخن لوح القدم، ضعف عام، فيما لم تعاني بقية الحيوانات من أي عارض سريري. بينت النتائج أن نسبة الإصابة الكلية بلغت ٥٥٪، إذ سجلت أعلى نسبة إصابة في الكلاب التي كانت تعاني من إصابات جلدية ٨٠,٩٪ وبفروق معنوية احصائياً عن باقي المجموع في حين سجلت أعلى نسبة إصابة في الكلاب السائبة مقارنة بالكلاب التي يتم تربيتها في المنازل ٦٢,٩٦ و ٣٨,٤٪ على التوالي وبفروق معنوية واضحة.

The serological diagnosis of canine *Leishmaniasis* by using ELISA in Nineveh province

W.A. Alobaidii

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq
email: wasenamjad@yahoo.com

Abstract

This study was to investigate the specific antibodies of *Leishmania* using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect the specific antibodies of the *Leishmania donovani complex (L.infatum, L.chagasi, L. donovani)* in 80 dogs of both types (domestic and stray dogs) of different ages and both sexes in the Nineveh Province for the period from May 2018 to October 2018. Some animals suffered from the appearance of skin ulcers in the face and quarters and diarrhea, vomiting, Paw pad fissures, the other animals did not show any clinical finding. The results showed that the total infection rate was 55%, the highest percentage of dogs with skin lesions 80.9% with significant differences with other groups, the stray dog's groups recorded high infective rate when compared with domestic dog group 62.96 and 38.4% respectively with significant differences.

Keywords: Canine, Leishmaniasis, ELISA

Available online at <http://www.vetmedmosul.com>

المقدمة

العيش داخل الخلايا ينتمي الطفيلي الى صنف *Kinetoplastida* عائلة *Trypanosomatidae*، جنس *Leishmania* (١). ينتقل الطفيلي بعدة طرائق من أهمها الانتقال بواسطة أنثى ذباب الرمل *Sand fly* من جنس *Phlebotomous* إذ تعتبر لسعة أنثى ذباب

داء الليشمانيا من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان يسببه طفيلي الليشمانيا الذي يعد من الأوالي الطفيلية المجبرة

المواد وطرائق العمل

حيوانات الدراسة

تضمنت الدراسة ٨٠ حيوانا من الكلاب بانواعها (تربيه منزلية وسائبة) وبمختلف الأعمار ولكلا الجنسين، كان يعاني البعض منها ظهور تقرحات جلدية في منطقة الوجه والأطراف مع حصول إسهال مدمم، تقيؤ، تضخم العقد اللمفية، تشققات مع تتخن لوح القدم ضعف عام، فيما لم تعاني بقية الحيوانات من أي عرض سريري.

جمع العينات

تم جمع الدم من الحيوانات من الوريد الراسي Cephalic vein بواقع ٣ مل، وضع الدم بعدها في أنابيب معقمة ترك الدم لحين تخثره، ومن ثم نقلت الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي ١٥٠٠ دورة / دقيقة ١٠ دقائق ومن ثم فصل المصل ووضع في أنابيب ابندروف وحفظ في -٣٠م° لحين إجراء الاختبارات المصلية (١٢).

اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر

استخدمت عدة هذا الاختبار والمصنع من قبل شركة Euroimmun ذو حساسية ٩٧٪ وخصوصية ٩٩٪ وذلك للكشف عن الأضداد المتخصصة لمعقد طفيلي الليشمانيا وباستخدام المستضد المتأشب Recombinant Antigen في أمصال الكلاب بتخفيف ١:١٠١ حيث تم إجراء الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة للعدة التشخيصية.

التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام اختبار مربع كاي ضمن برنامج الحاسوبي (Spss program.V. 19)

النتائج

بينت نتائج الفحص السريري للحيوانات المستخدمة قيد الدراسة نسبة إصابة كلية ٥٥٪ وباستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر، تفاوتت نسبة الإصابة في الحيوانات حسب العرض السريري الظاهر على الحيوانات حيث سجلت الحيوانات لتي تعاني من تقرحات جلدية في منطقة الوجه والأطراف اعلى نسبة إصابة ٨٠,٩٪ فيما سجلت الحيوانات التي تعاني من تشققات مع تتخن لوح القدم اقل نسبة إصابة ٣٣,٤٪ تفاوتت نسب الإصابة لبقية الحيوانات بين هاتين النسبتين، وعند معالجة النسب المئوية كل اصابة احصائيا تبين عدم وجود فروق احصائية بينها فيما عدا الحيوانات التي عانت من تقرحات جلدية في منطقة الوجه والأطراف (الجدول ١) (الأشكال ١-٣).

الرمل من اهم طرق الانتقال، كذلك يمكن أن تنتقل الإصابة جنسيا، خلقيا من الأم لأجنتها، عملية نقل الدم من الحيوان المصاب الى السليم منها (٢)، ويمكن أن تنتقل الإصابة من خلال استخدام المحاقن الطبية المستخدمة لأكثر من مرة (٣)، تعتبر الكلاب والقوارض من اهم المضائف الخازنة للطفيلي (٤).

يظهر المرض بثلاث أشكال: الشكل الأول يطلق عليه الليشمانيا الجلدية حيث يسبب هذا الشكل الأنواع *L. major*، *L. mexicana*، *L. chagasi*، *L. aethiopica*، *L. tropica*، *L. infantum*، *L. panamensis*، *L. amazonensis*، *L. braziliensis*، *L. guayanensis*، *L. peruviana* and الشكل الثاني يطلق عليه الجلدي المخاطي mucocutaneous حيث يسبب هذا الشكل الأنواع *L. infantum* and *L. donovani*، *L. panamensis*، *L. braziliensis*، اما الشكل الثالث فيسمى الشكل الحشوي وتسببه الأنواع *L. donovani*، *L. chagasi*، *L. infantum* and (٦،٥).

يمتاز الشكل الجلدي للمرض بانه الاكثر انتشارا ويظهر بشكل افات جلدية تتمثل بالتهاب الجلد، تشققات مع تتخن لوح القدم Paw pad fissures، بثور وتقرحات جلدية في منطقة الوجه، في حين يمتاز الشكل الحشوي بحصول اسهال مدمم مع تقيؤ فضلا عن ظهور الآفات الجلدية لذا فمن الصعب التفريق بين الشكلين السابقين أما الشكل الجلدي المخاطي فيمتاز بحصول بتر كلي أو جزئي للأغشية المخاطية للفم، الأنف وللحجرة (٧).

إن التشخيص الدقيق لطفيلي الليشمانيا يعتبر من احد المشاكل التي تواجه الباحثين وذلك بسبب كثرة أعراض المرضية التي تلاحظ على الحيوان، لذلك فمن الضروري القيام بالاختبارات التشخيصية الملائمة والمبكرة عند حصول المرض بأعراضه المرضية الظاهرة وغير الظاهرة على الحيوان، يستخدم في التشخيص الاختبارات المباشرة وغير المباشرة (٨)، تعتبر اختبارات الكشف عن amastigote الطفيلي في الأنسجة والكشف عن دنا الطفيلي من احد الطرق الفاعلة في التشخيص، ويمكن الكشف السريع عن الإصابة باستخدام اختبارات الكشف عن الأضداد المتخصصة للطفيلي ومن هذه الاختبارات، اختبار التلازن غير المباشر، التألق المناعي غير المباشر واختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم - غير المباشر (٩).

توجد دراسات عديدة للكشف عن الطفيلي واضداده النوعية باستخدام الاختبارات السريعة في الكلاب الا ان هذه الدراسات تفتقر الى اختبارات اكثر خصوصية وحساسية (١٠) ومع بدء العمليات العسكرية لتحرير مدينة الموصل وهجرة الالاف من المواطنين نحو المخيمات وتحت وطئه ظروف معيشية قاسية مع تردي الأوضاع الصحية والخدمية فيها مما هيا البيئة الخصبة لانتشار الأمراض ومنها مرض الليشمانيا، حيث سجلت حالات إصابات عديدة بهذا الطفيلي في المستشفيات الميدانية وبنسب مرتفعة وحسب تقرير منظمة الصحة العالمية لعام ٢٠١٧ (١١) ولكون الكلاب تلعب دورا اساسيا وخازنا للطفيلي توجب اجراء هذا البحث للوقوف على نسب انتشار الطفيلي في الكلاب وباستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر.

بمختلف الاعمار والاجناس ونظم التربية فضلا عن تاثر البعض منها باعراض سريرية تشير الى اصابتها بالطفيلي مقارنة بالسليمة منها ظاهريا.



الشكل ١: يمثل الإسهال المدمم لاجراء كلب الراعي الماني والموجب لأضداد داء الليشمانيا باستخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم.



الشكل ٢: يمثل تشققات مع تشخن لوح القدم لاجراء كلاب الراعي الماني والموجب لأضداد داء الليشمانيا باستخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم.



الشكل ٣: يمثل التقرحات الجلدية في منطقة الوجه لاجراء الكلاب السائبة والموجبة لأضداد داء الليشمانيا باستخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم.

الجدول ١: يبين علاقة نسبة الإصابة بالاعراض السريرية الظاهرة على الحيوانات والسليمة منها ظاهريا وباستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر

نوع العرض السريري	عدد الحيوانات الإيجابية (%)	عدد الحيوانات
تقرحات جلدية في الوجه والأطراف	a (٨٠,٩)	٢١
إسهال مدمم مع تقيؤ	b (٤٥,٤)	١١
تضخم العقد اللمفية	b (٧٠,٠)	١٠
تشققات مع تشخن لوح القدم	b (٣٣,٤)	٩
ضعف عام	b (٤٥,٤)	١١
سليمة ظهريا	b (٣٨,٩)	١٨
العدد الكلي	(٥٥,٠)	٨٠

الاختلاف بالأحرف يعني أن القيم تختلف معنويا تحت مستوى احتمال $P < 0.05$.

اظهرت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة اصابة كانت في الكلاب السائبة حيث بلغت نسبة الإصابة فيها ٦٢,٩٦٪ في حين بلغت نسبة الإصابة في الكلاب التي يتم تربيتها في المنازل ٣٨,٤٪ وبوجود فروقا معنوية بين المجموعتين (الجدول ٢).

الجدول ٢: يبين نسبة الإصابة في الكلاب حسب نظم تربيتها

نظام تربية الكلاب	عدد الحيوانات	عدد الحيوانات الايجابية (النسبة المئوية)
منزلية	٢٦	a (٣٨,٤٠)
سائبة	٥٤	b (٦٢,٩٦)
العدد الكلي	٨٠	(٥٥,٠٠)

الاختلاف بالأحرف يعني أن القيم تختلف معنويا تحت مستوى احتمال $P < 0.05$.

المناقشة

يشكل داء الليشمانيا خطرا على صحة الحيوان والإنسان على حد سواء وتسبب الإصابة به باستجابة مناعية خلطية وخلوية، تتمثل الاستجابة المناعية الخلطية بتكوين أضداد نوعية متخصصة، لذا استخدم هذا النوع من الاستجابة المناعية لتشخيص الإصابة بهذا المرض للكشف عن الكلوبيولينات المناعية المتخصصة باستخدام الاختبارات المصلية بانواعها العديدة والمتباينة بحساسيتها وخصوصيتها للأضداد النوعية للطفيلي (١٣).

تمت في هذه الدراسة التقصي عن الأضداد النوعية لمعقد طفيلي *Leishmania L. infatum* و *L.chagasi and L.donovani* وباستخدام المستضد المتأشب لثمانين حيوانا *donovani complex*

المصادر

1. Urquhart GM, Armour G, Duncan GL, Dun AM, Jennings FW. Veterinary parasitology. 2nd ed. Scotland: Blackwell Science; 2003. p 218.
2. Chiragkumar J, Jimishaben D. Review on Leishmaniasis. Biomed J Sci Tech Res. 2017;1(5):1-3. DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000460
3. Dietmar S. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors. 2017;10:1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
4. Abrha B, Mebrahtu B, Endalemaw G, Habtamu T, Yohannes T, Yohannes H, Adugna A, Messele G, Tehetna A, Getachew G, Abraham A. Serological investigation of visceral Leishmania infection in human and its associated risk factors in Welkait District, Western Tigray, Ethiopia. Parasite Epidemiol Control. 2018;3:13-20. doi: 10.1016/j.parepi.2017.10.004
5. Dianella S. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2015;9(6):588- 596. DOI: 10.3855/jidc.6833
6. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. Microb Pathogen. 2005;38(4):147-60. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.11.002
7. Barbora D. Optimization of Leishmania antigen formulation for the diagnosis of canine leishmaniasis [diploma study]. Karlova: University of Karlova V Praze; 2015. P:16-24.
8. Ehab KE, Antonio SM, Javier R, Ahmad A, Jose M, Navarro M, Jose G. Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2014;8(8):961-972. doi:10.3855/jidc.4310
9. Shyam S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5): 951-958. doi: 10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002
10. Jwher DM. Prevalence and distribution of canine visceral leishmaniasis antibodies in dogs in Mosul City. Iraqi J Vet Sci. 2012; 26(2): 63-67. DOI: 10.33899/ijvs.2012.67443
11. WHO Special Situation Report Mosul Crisis, Iraq Issue No 8: 19 February to 28 February, 2017. p.1-4.
12. Nikita I. Vaccination against leishmania: immunological challenges and review on available options in laboratory animals and dogs [master's thesis]. Ghent: Faculty of veterinary medicine; 2016. p.9-12.
13. Ivete L, Joilson A, Ferreira B, Henk S, Maria P, Diego A, Paulo M, Dorcas L, Carlos H. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2017;59:1-10. doi: 10.1590/S1678-9946201759039.
14. Sergio V, Marta C, Michele T, Tommaso F, Alda N. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests Lesiscan. Parasits Vectors. 2014;7(1):111. doi: 10.1186/1756-3305-7-111.
15. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. Vet Parasitol. 2006;144(1-2): 162-166. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.09.017
16. Paola MB. Leishmaniasis: Immunologic indicators of clinical progression and mechanisms of immune Modulation [PhD dissertation]. Iowa: Iowa State University; 2010. p.87.
17. Paolo S. New clinic-pathological findings and prognostic Factors of canine leishmaniasis in endemic and non-endemic area [PhD dissertation]. Barcelona: University of Barcelona; 2016. P 150. <https://ddd.uab.cat/record/166003>
18. Julie JH. Importation of stray dogs from Hungary and Romania into Norway [master's thesis]. Budapest: Faculty of Veterinary Science, University Budapest; 2013. p. 26. <http://www.huveta.hu/bitstream/handle/10832/981/HolterJulieJahrenThesis.pdf?sequence=1&isAllowe d=y>

بينت نتائج الدراسة أن نسبة الإصابة الكلية كانت ٥٥٪، وعند مقارنة نتائج دراستنا مع دراسات سابقة في محافظة نينوى (١٠) فيتبين أن نسبة الإصابة كانت مرتفعة مقارنة مع الباحث انف الذكر إذ بلغت نسبة الإصابة ١٤٪، إن سبب هذا التباين يعود لأسباب عديدة منها الاختلاف في نوع الاختبارات المصلية المستخدمة، إذ استخدم في دراسته تقنية الاختبار السريع باستخدام التحليل المناعي المعتمد على الغشاء النوعي والمتخصص فقط لليشمانيا الحشوية حصراً، بينما يعتبر اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر أكثر خصوصية وحساسية فضلاً عن كشفها لأضداد المستضد المعدل للطفيلي، حيث ذكر Sergio *et al* (١٤) أن اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر ذات حساسية وخصوصية عالية مقارنة بالاختبارات المصلية الأخرى. بينما بينت دراسة أخرى تمت فيها مقارنة دقة وحساسية نوعين من الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر واختبار التآلق المناعي غير المباشر و تقنية الاختبار السريع باستخدام التحليل المناعي المعتمد على الغشاء النوعي، حيث تبين أن أكثر اختبارين ذو دقة عالية هما الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم غير المباشر وكذلك بين الباحث انف الذكر ان المستضد النوعي المستخدم في التقنية كلما كانت بروتيناته معقدة ومتعددة كلما زادت دقة وخصوصية الاختبار (١٥،٧) ويمكن أن يعزى ارتفاع نسبة الإصابة أيضاً الى اختيار الكلاب المصابة في دراستنا إذ تعتبر دراسة مستهدفة للكشف عن اضرار الطفيلي فضلاً عن الاختلاف في زمن وظروف جمع العينات نتيجة للظروف التي حدثت في محافظة نينوى نتيجة الهجرة الجماعية وانشاء مخيمات الايواء أثناء أحداث ٢٠١٧ وحسب ما تم ورد ذكره من قبل تقرير منظمة الصحة العالمية لعام ٢٠١٧ (١١).

وعند مقارنة نسبة الإصابة بالاعراض السريرية الظاهرة على الحيوانات بينت النتائج ان نسبة الإصابة في الحيوانات لتي تعاني من تقرحات جلدية في منطقة الوجه والأطراف اعلى نسبة إصابة ٨٠,٩٪ وتباينت النسب في المجاميع الأخرى، إن سبب هذا التباين في نسب الإصابة يعود لاسباب عديدة منها: مرحلة الإصابة بالطفيلي، الاستجابة المناعية الفردية لكل حيوان، عمر الحيوان، شكل المرض، نوع الطفيلي (١٦،١٧).

وعند مقارنة نسبة الإصابة بنظم التربية تبين ان اعلى نسبة اصابة كانت في الكلاب السائبة مقارنة بالكلاب المنزلية، وقد يعود سبب هذا التباين الى الاهتمام الصحي بالكلاب المنزلية من حيث متابعتها بيطريا ومعالجتها الدورية بالمضادات الطفيلية، ومكافحة الطفيليات الخارجية فضلاً عن الاهتمام المتزايد بالنظافة العامة لها نظراً لتعامل المربي المباشر معها مما يقلل فرصة إصابتها بالطفيلي (١٨).