تشخیص مولکولی لیشمانیوز در سگ با استفاده از نمونه‌های سواب چشمی و بافی‌کوت خون

محمدرضا آریان‌نژاد[۱]، غلامرضا رزمی[۲]*، جواد خوش‌نگاه[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد بخش انگل‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: razmi@um.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۸/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۱/۱۰)

Archive of SID

چکیده

روش‌های مولکولی زیادی جهت تشخیص لیشمانیوز در سگ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. در این موارد بیشتر با روش‌های تهاجمی از بافت‌ها نمونه‌برداری می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی استفاده از دو روش نمونه‌برداری غیرتهاجمی برای تشخیص لیشمانیوز در آزمایش PCR می‌باشد. بدین منظور، تعداد ۶۰ قلاده سگ انتخاب شده و به‌طور مساوی به سه گروه: سگ‌های خانگی واجد جراحات جلدی (گروه اول)، سگ‌های خانگی فاقد جراحات جلدی (گروه دوم) و سگ‌های ولگرد (گروه سوم) تقسیم شدند. پس از معاینه بالینی نمونه‌های سواب چشمی و بافی‌کوت خون از هر سگ تهیه گردید. علاوه بر این در گروه اول گسترش نسجی نیز از ضایعات جلدی تهیه شد. ابتدا DNA نمونه‌های سواب چشمی و بافی‌کوت استخراج شده و جهت تعیین گونه‌های لیشمانیا با روش‌های PCR و Seminested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. سه نمونه مثبت جهت تأیید تشخیص نیز تعیین توالی گردیدند. گسترش‌های خونی نیز با گیمسا رنگ‌آمیزی شده و به‌صورت میکروسکوپی مورد آزمایش قرار گرفتند. از مجموع ۶۰ سگ مورد آزمایش، در چهار نمونه DNA سواب چشمی مربوط به گروه ۳ و یک نمونه DNA سواب چشمی و بافی‌کوت مربوط به گروه اول آلودگی به *لیشمانیا اینفانتوم* تعیین گردید. همچنین در نمونه اخیر، اجسام لیشمن در گسترش رنگ‌آمیزی شده مشاهده گردید. بر اساس نتایج مولکولی و تعیین توالی به‌دست آمده نتیجه‌گیری شد که *لیشمانیا اینفانتوم* در بین سگ‌های مشهد شایع بوده و هم‌چنین نمونه‌های سواب چشمی می‌تواند به عنوان یک روش نمونه‌برداری غیرتهاجمی مناسب برای آزمایش ملکولی تشخیص لیشمانیا در سگ مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: لیشمانیا، سواب چشمی، بافی کوت، روش‌های مولکولی، سگ.

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیا به‌عنوان تک‌یاخته نسجی از اهمیت بهداشتی بالایی در پزشکی و دامپزشکی برخوردار است. این انگل به‌وسیله پشه‌های خاکی فلبوتومینه از جنس‌های فلبوتوموس و لوتزمیا (به ترتیب در دنیای قدیم و دنیای جدید) به میزبان‌های حساس منتقل می شود (Baneth *et al.*, 2005). تاکنون در حدود ۳۰ گونه لیشمانیا شناسایی شده که ۲۰ گونه آن در انسان بیماری‌زا هستند و سبب بروز لیشمانیازیس جلدی و احشایی می‌گردند (Dantas-Torres 2007). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی سالانه بیش از دویست میلیون از جمعیت جهان در معرض ابتلا به بیماری هستند (Baneth *et al.*, 2005). سگ‌ها مخزن اصلی *لیشمانیا اینفانتوم* عامل لیشمانیازیس احشایی بوده و یکی از عوامل مهم چرخه انتقال بیماری به انسان محسوب می‌گردند (Dantas-Torres, 2007; Baneth *et al.*, 2005). بر اساس مطالعات انجام‌شده لیشمانیازیس احشایی ناشی از *لیشمانیا اینفانتوم* به‌صورت گسترده در حوزه مدیترانه و خاورمیانه وجود دارد (Baneth *et al.*, 2005).

علائم بالینی لیشمانیازیس احشایی در سگ، از فرم بدون نشانه همراه با آلودگی محدود تا فرم کشنده متغیر بوده و بسته به حدت انگل و استعداد ژنتیکی میزبان متفاوت است. دوره نهفته بیماری از چند ماه تا چندین سال طول می‌کشد (Baneth *et al.*, 2005). مطالعات سرواپیدمیولوژیک نشان داده است که تعداد زیادی از سگ‌های فاقد نشانه بالینی از نظر سرمی مثبت هستند (Moshfe *et al.*, 2009). برای پیشگیری از لیشمانیازیس احشایی انسان، تشخیص سریع و دقیق سگ‌های آلوده ضروری است. برنامه‌های کنترل به دلایلی همچون آلودگی بالای سگ‌ها در مناطق اندمیک، عدم حساسیت آزمایشات تشخیصی برای شناسایی آنها و تأخیر زمانی بین تشخیص و حذف سگ‌های آلوده ممکن است فاقد کارآیی لازم باشند (Solano-Gallego *et al.*, 2009). در سال‌های گذشته روش‌های استاندارد برای تشخیص انگل شامل روش‌های میکروسکوپی، کشت آسپیره طحال، عقده‌های لنفاوی و مغز استخوان بود که در مجموع از حساسیت متغیر و نسبتاً پایینی برخوردار هستند (Solano-Gallego *et al.*, 2009). آزمایشات سرولوژیکی در شناسایی موارد بالینی سگ‌های آلوده واجد اهمیت هستند، اما در نمونه‌های تحت‌بالینی ممکن است حساسیت پایین‌تری نشان دهند (Lombardo *et al.*, 2012). در مواردی نیز این آزمایشات به‌دلیل ارائه عیار ناقص آنتی‌بادی یا واکنش متقاطع بی‌نتیجه مانده‌اند. امروزه روش‌های PCR با استفاده از DNA لیشمانیا به‌علت حساسیت و ویژگی بالا به‌عنوان روشی فراگیر برای تشخیص لیشمانیازیس احشایی در فرم بالینی و تحت‌بالینی کاربرد دارند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). تاکنون نمونه‌های مختلف بافتی از سگ شامل: آسپیره مغز استخوان، طحال، عقده‌های لنفاوی، خون، ادرار، سواب ملتحمه و بیوپسی چشم با روش PCR، مورد استفاده قرارگرفته‌اند (Maia *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2004). در این میان خون و مغز استخوان معمولاً رایج‌ترین بافت‌های مورد استفاده هستند (Baneth *et al.*, 2005). اکثر این نمونه‌ها با روش تهاجمی تهیه شده که در سگ با درد همراه می‌باشد، اما نمونه‌برداری غیرتهاجمی در سگ ساده‌تر

www.SID.ir

بوده و بدون درد انجام شده و توسط صاحب سگ آسان‌تر مورد پذیرش قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که به‌علت وجود لیشمانیا در ملتحمه چشم سگ‌های بیمار، نمونه‌های به‌دست آمده از ملتحمه چشم منبع خوبی برای استخراج DNA لیشمانیا هستند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2008; de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). لیشمانیا می‌تواند توسط گردش خون به این نقطه رسیده باشد یا اینکه در مناطق بومی به‌علت تراکم بالای ناقلین و گزش مستقیم اطراف چشم سگ، وارد آن شده باشد (de Almeida Ferreira *et al.*, 2008). همچنین نمونه بافی‌کوت خون نیز به‌خوبی در آزمایشات مولکولی تشخیص لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته است (Lachaud *et al.*, 2002). در یک مطالعه، نمونه بافی‌کوت خون و نمونه سواب ملتحمه چشم حساسیت و ویژگی بالایی در تعیین عامل لیشمانیازیس در سگ با روش PCR از خود نشان داده‌اند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). با توجه به اهمیت تشخیص لیشمانیوز احشایی در سگ، هدف این مطالعه بررسی کارآیی استفاده از روش نمونه‌برداری از ملتحمه چشم و مقایسه با نمونه بافی-کوت از خون برای تشخیص مولکولی لیشمانیا، در سگ‌های شهرستان مشهد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

مطالعه حاضر در بازه زمانی آذر ماه ۱۳۹۱ تا تیر ماه ۱۳۹۲ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه بخش انگل‌شناسی انجام گرفت. در این مدت، تعداد ۶۰ قلاده سگ (به تفکیک تعداد ۳۳ قلاده سگ نر و ۲۷ قلاده سگ ماده)، که در محدود سنی ۳ ماه تا ۱۲ ساله و شامل نژادهای ژرمن شفرد ۱۳قلاده، دوبرمن ۵ قلاده، ترییر ۱۲ قلاده و نژاد مخلوط ۳۰ قلاده بودند، توسط متخصص بیماری‌های داخلی دام‌های کوچک معاینه شده و بر اساس وجود و یا عدم وجود علائم بالینی به‌طور مساوی مطابق مشخصات در سه گروه: سگ‌های صاحب‌دار دارای نشانه بالینی، سگ‌های صاحب‌دار فاقد نشانه بالینی و سگ‌های ولگرد قرار گرفتند. سگ‌های خانگی با رضایت صاحب حیوان در گروه‌های مطالعاتی قرار گرفتند و طی مدت مطالعه تمام اصول اخلاقی در ارتباط با حیوان رعایت گردید.

خون‌گیری از شریان سفالیک انجام شد و نمونه خون هر سگ به میزان ۵ میلی‌لیتر به‌طور جداگانه در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید. همزمان توسط سواب پنبه‌ای استریل تراشه‌های سلول‌های اپی‌تلیال ملتحمه چشم راست و چپ سگ به‌طور جداگانه برداشت شد. همچنین از سگ‌های واجد ضایعات جلدی گسترش نسجی تهیه گردید. نمونه‌های خون به لوله‌های هماتوکریت منتقل شده و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه بافی‌کوت تشکیل شده در این لوله‌ها برداشت شده و در میکروتیوب جمع‌آوری شدند (شکل ۱). نمونه‌های بافی‌کوت و سواپ چشمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش PCR نگه‌داری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- روش نمونه‌برداری از چشم سگ با استفاده از سواب

آزمایش انگل شناسی

در آزمایشگاه انگل‌شناسی، ابتدا گسترش‌های نسجی با متانول تثبیت و با رنگ گیمسای ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردیدند، سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و عدسی شیئی ×۴۰ و ×۱۰۰ اقدام به جستجوی اجسام لیشمن شد.

استخراج DNA و آزمایش PCR

DNA بافی‌کوت و سواب چشمی توسط کیت تجاری MBST مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد(DNA Extraction Kit تهیه شده در مرکز رشد زیست فناوری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک – تهران). به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده، مقداری از آن روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید. پس از پایان عملیات استخراج، نمونه‌های DNA تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

آزمایش PCR جهت تشخیص گونه‌های لیشمانیا در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول برای تعیین جنس لیشمانیا، نمونه‌های DNA استخراج شده از بافی-کوت و نمونه های چشمی با متد لاچاد و همکاران با استفاده از پرایمرهای RV1 و RV2 مورد آزمایش قرار گرفتند (Lachaud *et al.*, 2002). نمونه‌های مثبت واجد باند قابل رویت 145 bp می‌باشند. در مرحله دوم نمونه-های مثبت در آزمایش اولیه، جهت تشخیص مولکولی گونه‌های *لیشمانیا اینفانتوم*، *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* با متد آرانسای و همکاران و با استفاده از پرایمرهای LINR4، LIN17 و LIN19 مورد آزمایش Semi-nested PCR قرار گرفتند (Aransay *et al.*, 2002). برای انجام هر واکنش PCR از مسترمیکس PCR (ساخت شرکت بیونیر- کره جنوبی) و از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده شد. باند حاصل برای *لیشمانیا اینفانتوم* ۷۲۰ جفت باز، برای *لیشمانیا تروپیکا* ۷۶۰ جفت باز و برای *لیشمانیا ماژور* ۶۵۰ جفت باز می‌باشد.

تعیین توالی

محصول PCR سه نمونه مثبت جهت تعیین توالی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال شدند. پس از تعیین خوانش نمونه‌های ارسالی، ترادف نوکلئوتیدی نمونه-

www.SID.ir

های ارسالی با استفاده از نرم‌افزار Clc main work با توالی شناخته شده نمونه‌های لیشمانیا در بانک ژنی NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

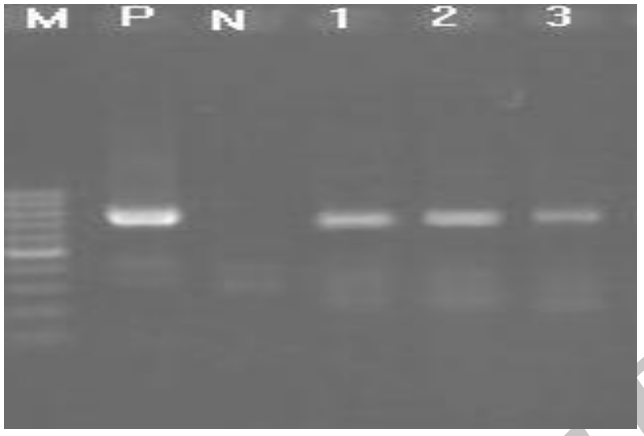
ضایعات جلدی در گروه اول سگ‌های خانگی مورد مطالعه (تعداد ۲۰ قلاده)، بیشتر در اطراف بینی، پوزه، دهان، چشم و گوش قابل مشاهده بودند و در این گروه فقط در گسترش رنگ‌آمیزی شده یک قلاده سگ، آماستیگوت‌های لیشمانیا مشاهده شد. نتایج آزمایش PCR مرحله اول نشان‌دهنده آلودگی هم‌زمان یک نمونه بافی‌کوت خون و سواب چشمی در یک قلاده سگ از گروه اول (سگ‌های صاحب‌دار واجد جراحات جلدی) بوده و ٤ نمونه سواب چشمی در گروه سوم (سگ‌های ولگرد) بودند (شکل ۲).

شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی جنس لیشمانیا (نمونه‌ها روی ژل آگارز (۲٪) رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید). M: باند حاصل از Ladder 100، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی. در شماره‌های ۱،۲،۳،۴،۵ نمونه‌های ۳-۱ مثبت می‌باشند و نمونه‌های ۵-۴ از نظر وجود لیشمانیا منفی هستند (باندهای 145 bp نشان‌دهنده وجود جنس لیشمانیا می‌باشد).

در گروه سوم (سگ‌های صاحب‌دار فاقد نشانه بالینی) هیچ نمونه مثبتی یافت نشد. آزمایش تشخیص گونه‌های لیشمانیا با روش مولکولی Seminested PCR روی نمونه‌های مثبت بافی‌کوت و سواپ چشمی صورت گرفت که تمام نمونه‌ها، آلوده به *لیشمانیا اینفانتوم* بودند (شکل ۳).

نتایج مقایسه هم‌ردیفی توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های بانک ژنی نیز آلودگی به *لیشمانیا اینفانتوم* را در سه نمونه ارسالی تأیید کرد.

www.SID.ir



شکل ۳- نتیجه الکتروفورز محصول Semi–nested PCR جهت شناسایی گونه‌های لیشمانیا (نمونه‌ها روی ژل آگارز (۲٪) رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید). M: باند حاصل از Ladder 100 bp، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی. شماره‌های ۱،۲،۳ نمونه‌های نشان‌دهنده وجود *لیشمانیا اینفانتوم* با باند bp720 می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر فقط در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده یک قلاده سگ صاحب‌دار دارای ضایعات جلدی، اجسام لیشمن دیده شد. نتایج آزمایش میکروسکوپی نشان داد این روش با وجود درجه ویژگی بالا از حساسیت پایین در تشخیص لیشمانیازیس سگ به‌خصوص هنگامی که تعداد انگل در بافت کم است، برخوردار است (Srividya *et al*., 2007). به‌همین دلیل، امروزه روش PCR به‌علت حساسیت و ویژگی بالا بر اساس ردیابی DNA اختصاصی لیشمانیا در مطالعات زیادی به منظور تشخیص و تعیین هویت انگل لیشمانیا در بافت‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است (Solano-Gallego *et al*., 2009; Srividya *et al*., 2012; Strauss *et al*., 2004).

تهیه نمونه بافتی برای آزمایش PCR در سگ‌های زنده از اهمیت زیادی برخوردار است و به دلیل استفاده از روش‌های نمونه‌برداری تهاجمی، در اکثریت موارد این نمونه به سختی در سگ تهیه می‌گردد. امروزه محققین سعی و تلاش در نمونه‌برداری از بافت‌ها به‌صورت غیرتهاجمی و بدون درد در سگ‌ها دارند تا نمونه‌برداری آسان‌تر مورد پذیرش صاحبان سگ قرار گیرد (Strauss *et al*., 2004). تحقیقات نشان داده است که نمونه‌های به‌دست آمده از ملتحمه چشم منبع خوبی برای استخراج DNA لیشمانیا هستند و نتایج PCR به‌دست آمده روی این نمونه‌ها از حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص لیشمانیازیس در سگ برخوردار بوده‌اند (Leite *et al*., 2011; de Almeida Ferreira *et al*., 2012; de Almeida Ferreira *et al*., 2008).

نمونه سواب تهیه شده از ملتحمه چشم به‌طور موفقیت‌آمیزی در تشخیص لیشمانیوز احشایی در سگ‌های فاقد علائم نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Leite *et al*., 2010) و حتی در مقایسه با سایر روش‌های نمونه‌برداری با روش تهاجمی نیز کارآمدتر بوده است (Lombardo *et al*., 2012). در مطالعه حاضر ارزیابی نتایج تشخیص مولکولی لیشمانیا روی نمونه‌های سواب ملتحمه چشم و بافی‌کوت خون نشان

www.SID.ir
Archive of SID

داد که نمونه‌های سواب چشمی (۵ نمونه) در مقایسه با بافی‌کوت خون (۱ نمونه) در تشخیص لیشمانیازیس سگ با روش مولکولی کارآیی بیشتری دارند. در مطالعه‌ای مشابه در برزیل نیز نمونه‌های سواب چشم و بافی‌کوت را برای تشخیص ملکولی لیشمانیازیس احشایی مورد آزمایش قرار دادند. برای این منظور دو گروه ۲۳ تایی از سگ‌های سرم مثبت در نظر گرفته شد و نمونه‌های سواب از ملتحمه هر دو چشم و بافی‌کوت جمع‌آوری شدند. پس از انجام آزمایش‌های مولکولی، میزان آلودگی در نمونه های سواب چشمی گروه یک و دو به ترتیب ۷۳/۹ درصد و ۵۲/۲ درصد برآورد شد، در حالی‌که این میزان آلودگی در نمونه‌های بافی‌کوت این دو گروه به ترتیب ۱۳ درصد و ۳۰/٤ درصد بودند (de Almeida Ferreira *et al*., 2008). در مطالعه حاضر *لیشمانیا اینفانتوم* به‌عنوان تنها گونه آلوده‌کننده ۲۰ درصد سگ‌های ولگرد و ۵ درصد سگ‌های خانگی دارای نشانه بالینی، تشخیص داده شد. نتایج به‌دست آمده با سایر مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در بین سگ‌های ایران (Mohebali *et al*., 2005; Mohebali *et al*., 2011; Haddadzade *et al*., 2013; Hosseininejad *et al*., 2012; Mostafavi *et al*., 2014) و شهرستان مشهد (Heidarpour *et al*., 2012; Sabzavari *et al*., 2013) هم‌خوانی دارد. در این مطالعه آلودگی سگ‌ها *به لیشمانیا تروپیکا* مشاهده نگردید. نتایج مولکولی و تعیین توالی نیز موید این نتیجه می‌باشد. تاکنون گزارشات اندکی از آلودگی سگ‌ها به *لیشمانیا تروپیکا* در ایران گزارش شده است (Mohebali *et al*., 2011; Mohebali *et al*., 2005). بر اساس نتایج مطالعه حاضر *لیشمانیا اینفانتوم* به عنوان عامل اصلی لیشمانیازیس احشایی در سگ‌های شهرستان مشهد تعیین گردید و از طرفی نمونه سواب چشمی به عنوان یک روش ساده و کاربردی می‌تواند در تشخیص مولکولی لیشمانیازیس احشایی در سگ مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

منابع

- Aransay, A., Scoulica, E. and Tselenti, Y. (2000). Detection and Identification of Leishmania DNA within Naturally Infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology, 66: 1933-1938.
- Baneth, G., Day, M., Roura, X. and Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In : Shaw, S. and Day, M. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat . London: Manson Publishing Ltd., pp: 89-99.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. Veterinary Parasitology, 149: 139-146.
- de Almeida Ferreira, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N. and de Andrade, A.S. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. Veterinary Parasitology, 152(3-4): 257-263.

www.SID.ir

- de Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., *et al*. (2012). Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of Leishmania infantum DNA in an endemic urban area in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases, 6(4): e1596.
- Haddadzade, H.R., Fattahi, R., Mohebali, M., Akhoundi, B. and Ebrahimzade. E. (2013). Seroepidemiologcal Investigation of Visceral Leishmaniasis in Stray and Owned Dogs In Alborz Province, Central Iran UsingDirect Agglutination Test. Iranian Journal of Parasitology, 8:152-157.
- Heidarpour, M., Pourtaghi, M. and Khoshnegah, J. (2012). Prevalence and Risk Factors for Canine Leishmaniasis in Mashhad, North East of Iran. Iran Journal of Veterinary Science and Technology, 4: 1-23.
- 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: 54-47.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. and Bastien, P. (2002). Comparison of six methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, 40: 210-215.
- Leite, R.S., Ferreira, Sde.A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N. and de Andrade, A.S. (2010). PCR diagnosisof visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Veterinary Parasitology, 170: 201-206.
- Leite, R.S., Mendes, V.C., Ferreira, A.L. and Andrade, A.S. (2011). The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. The Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 20: 36-41.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprì, A. and Solano-Gallego, L. (2012). Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Veterinary Parasitology, 184: 10-17.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L. and Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Veterinary Journal, 179: 142-144.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., *et al*. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Veterinary Parasitology, 125: 251-262.
- Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, Sh., Zarei, Z., *et al*. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Veterinary Parasitology, 129: 243-251.
- Mohebali, M., Malmasi, A., Hajjaran, H., Jamshidi, S., Akhoundi, B., Rezaei, M., *et al*. (2011). Disseminated Leishmaniasis Caused by Leishmania tropica in a Puppy from Karaj, Central Iran. Iranaian Journal of Parasitology, 2: 69-73.
- Moshfe, A., Mohebali, M., Edrissian, Gh., Zarei, Z., Akhoundi, B., Kazemi, B., *et al*. (2009). Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of L. infantum Infection. Acta Tropica, 112: 101-105.
- Mostafavi, M., Akhtardanesh, B., Sharifi, I., Kakooei, S., Khedri, J. and Bamorovat, M. (2014). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in southeast of Iran. Journal of Parasitic Diseases, 38: 218-222.
- Sabzavari, 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 Diseases, 37: 189-191.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardso, L., Penisi, M.G., Ferrer, L., *et al*. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. Veterniary Parasitology, 165: 1-18.

Archive of SID

www.SID.ir

- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R. and Salotra, P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. Parasitology Research, 110: 1065-1078.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L. and Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs. The Journal of Infectious Diseases, 189: 1729-33.

Archive of SID

www.SID.ir