Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، زمستان، شماره ۴، ۱۳۹۹، ۳۳۹۲-۳۳۸۳

بررسی مولکولی و تعیین آلودگی لیشمانیازیس احشایی در سگهای بدون علامت در مشکین شهر استان اردبیل ، شمال غربی ایران

روزبه تسلیمیان[۱]، بهار شمشادی[۱*]، عادل اسپوتین[۲]، رضا فتوحی اردکانی[۳]، نرمین نجف زاده[٤]

چکیده

انگل لیشمانیا اینفانتوم عامل اصلی ایجاد کننده لیشمانیازیس احشایی (Visceral leishmaniasis) است که طیف گسترده ای از انسان و سگها را در ایران تهدید می کند. هدف ما بررسی گونه های انگل لیشمانیا در مناطق آندمیک برای تشخیص لیشمانیازیس احشایی با استفاده از ژن ITS-rDNA ، توالی یابی و تجزیه و تحلیل فیلوژنی بود. در این مطالعه، نمونه برداری بوسیله لوله های خلاءدار حاوی EDTA از خون سگ های بدون علامت (۳۱ قلاده) با استفاده از روش غیر تهاجمی در اردبیل ، شمال غربی ایران در مرداد ماه ۱۳۹۸ انجام شد. DNA نمونه های جمع آوری شده استخراج شده، PCR و توالی یابی با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA انجام شد. برای نشان دادن وضعیت طبقه بندی گونه های لیشمانیا ، توالی ها به روش Maximum likelihood مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنی قرار گرفت. از مجموع ۳۱ نمونه سگ بدون علامت بدست آمده، ۱۱ سگ به طور قطع آلوده به L. infantum تشخیص داده شدند. بیشترین تعداد آلودگی در گروه سنی زیر ۵ سال بود که نشان داد این گروه نسبت به VL در این منطقه حساس تر هستند و آلودگی عمدتا در جنس مذکر مشاهده گردید. یافته های موجود نشان می دهد که نمونه برداری غیر تهاجمی و روش های مولکولی در تشخیص لیشمانیازیس احشایی قابل اطمینان و مناسب هستند. میزان شیوع VL در سگ های بدون علامت (۳۵,۵٪) نشان دهنده یک هشدار برای بررسی و نظارت بر افراد / مخازن حساس در منطقه است.

واژگان کلیدی: سگ های بدون علامت، لیشمانیازیس احشایی، روش غیر تهاجمی، PCR، اردبیل.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/٦/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۲/٤

مقدمه

انگل Leishmania infantum از طریق گزش پشه خاکی های زیر جنس Larrossious آلوده، منتقل شده و عامل لیشمانیازیس احشایی (VL) در ایران می‌باشد(۱). استانهای اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس، بوشهر، کرمان، قم و خراسان شمالی کانون‌های بومی VL در ایران شناخته شده‌اند (۲).

سگهای خانگی (*Canis familiaris*) که ارتباط تنگاتنگی با انسان دارند مخزن اصلی VL هستند(۳). مطالعات قبلی نشان می دهد که صاحبان سگهای آلوده و خانواده های آنها (عموماً زیر ۱۰ سال) بیشتر در معرض آلودگی می باشند(٤). VL به دلیل اینکه یک بیماری عفونی مزمن و غالباً کشنده محسوب می شود ، به عنوان یکی از هفده بیماری "گرمسیری" مهم توسط سازمان بهداشت جهانی شناخته شده است(۵) و علیرغم تلاش های بسیار، هیچ واکسن یا داروی پیشگیرانه ای برای آن وجود ندارد(٦). لیشمانیازیس احشایی سگ به اشکال مختلفی از بدون علامت تا حاد و کشنده(۷) ، با علائم غیر اختصاصی و متغیر ظاهر می شود (۸). کاشکسی ، ضایعات چشمی ، کم خونی و اسهال ، کاهش وزن ، بی اشتهایی ، خون دماغ ، درماتیت ، ریزش مو ، لنفادنوپاتی و زخمهای جلدی علائم بالینی در سگهای آلوده هستند(۹). سگ های بدون علامت به عنوان مخازن دائمی ولی پنهان در مناطق اندمیک می توانند از طریق گزش پشه خاکی باعث افزایش جمعیت سگها و انسان های آلوده به VL شوند. این سگهای بدون علامت سرم مثبت ممکن است به دلایل مختلف علائم بالینی را در طول زندگی از خود نشان دهند(۱۰). علاوه بر این، سگهای نر می توانند هنگام جفت گیری، سگ ماده را از طریق مایع منی آلوده کنند(۵). روش حیاتی برای کنترل VL در مناطق بومی و غیر بومی ، تشخیص زودهنگام مخازن بدون علامت است(۸). روشهای مولکولی ، بر خلاف ابزارهای سرولوژیکی ، قادر

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ، گروه پاتوبیولوژی ، تهران، ایران(bshemshadi@yahoo.com)
۲- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، تبریز، ایران.
۳- دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، قم، ایران.
٤- انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، بخش انگل شناسی، تهران، ایران

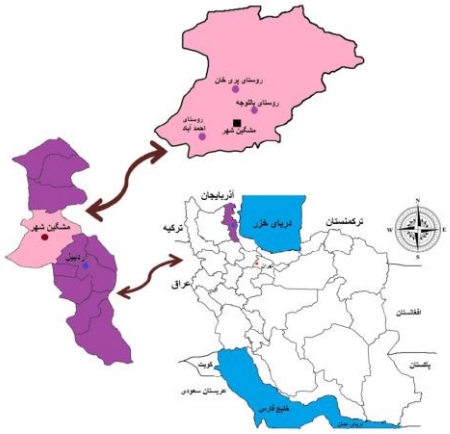
www.SID.ir

Archive of SID

به تفکیک دقیق گونه های *لیشمانیا* هستند. حساسیت و اختصاصیت (ویژگی) روش های مولکولی در تشخیص VL، هم در سگ و هم در انسان با متغیرهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته اند(۱۱). اختصاصیت تست های مولکولی اغلب ۹۵ تا ۱۰۰ درصد و این روش ها قادرند آلودگی های بین ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ انگل را در هر واکنش تشخیص دهند (٤). ژن ITS-rDNA مناسب ترین ژن برای تعیین قرابت های فیلوژنتیک در بین گونه های *لیشمانیا* است که قادر به تعیین جایگاه تاکسونومیک انگل ها در دنیای قدیم می باشد. این ژن بین ژنهای 18S و rRNA 5.8S قرار دارد.به علاوه ، این ژن حاوی لوکوس های محافظت شده با پلی مورفیسم قابل قبول برای شناسایی گونه ها است(۱۲). نمونه خون ، دارای بار انگلی بالایی می باشد و نمونه برداری از خون سگ روش غیر تهاجمی تری نسبت به نمونه برداری از غدد لنفاوی و مغز استخوان است(۱۳). هدف از این مطالعه شناسایی عوامل ایجاد کننده VL در سگهای بدون علامت در استان اردبیل با استفاده از نمونه برداری غیر تهاجمی و روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا می باشد.

مواد و روش کار

مشکین شهر سومین شهر بزرگ استان اردبیل بوده که با مرکز استان ۹۰ کیلومتر فاصله داشته و در ارتفاع ۱٤۰۰ متری از سطح دریا قرار دارد و یکی از کانون های شناخته شده لیشمانیازیس احشایی در ایران می باشد. براساس تقسیم‌بندی آب و هوایی، این شهرستان دارای چهار اقلیم مدیترانه‌ای گرم و خشک، مدیترانه‌ای معتدل، استپی سرد و کوهستانی سرد است. طول ماه‌های خشک و نیمه‌خشک و یخبندان آن پنج تا هشت ماه است و میزان بارندگی سالانه آن به‌طور متوسط ۳۰۰ میلی‌متر است. قسمت عمده پوشش گیاهی آن را استپی، درمنه، ممرز، بلوط و تنگرس تشکیل می‌دهد(پورتال سازمان هواشناسی کشور). نمونه برداری در مرداد ماه ۱۳۹۸ از روستاهای مختلف مشکین شهر با هماهنگی اداره دامپزشکی و شبکه بهداشت منطقه انجام شد. روستاهای مورد نمونه برداری بر اساس داده های جمع آوری شده از مراجع بهداشتی و دامپزشکی استان و گزارش های مربوط به بیماران مبتلا به VL ، انتخاب شدند.



نگاره ۱. نقشه ایران، استان اردبیل و مشکین شهر و روستاهای مورد نمونه برداری

سگهای نمونه برداری شده، بدون علامت بوده و به طور تصادفی از سگهای گله انتخاب شدند. برای اولین بار نمونه برداری غیر تهاجمی و بدون بی حسی در این استان انجام شد. نمونه خون از هر سگ با استفاده از لوله های خلاء حاوی EDTA از ورید سفالیک گرفته شد. نمونه ها ابتدا در دمای ٤ درجه سانتیگراد در محل نمونه گیری و بعد از آن در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور ایران نگهداری شدند. جزییات اطلاعات هر نمونه از جمله جنس ، سن و نژاد و نیز صاحبان و محل زندگی آنها در فرم هایی که از قبل آماده شده بود ثبت گردید. سن نمونه ها با سوال از صاحبان سگ تعیین شدروشهای به کار رفته در این مطالعه، طبق اصول بیان شده در بیانیه هلسینکی (١٤) انجام شده و توسط کمیته اخلاق تحقیقات انسانی و حیوانی انستیتوپاستور ایران

www.SID.ir

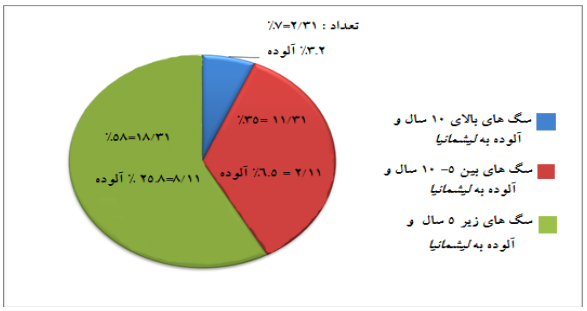
Archive of SID

(IR.PII.REC.1395.20) تایید شده است.DNA انگلها، مستقیماً از خون کامل، بر اساس پروتکل اصلاح شده فنل- کلروفرم (۳۴-۳۲) استخراج شدند. PCR برای شناسایی انگل *لیشمانیا* در سگهای مشکوک با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA که حدوداً ۴۸۰ جفت باز است به کار گرفته شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۰/۲ میکرولیتر بافر 1x Taq polymerase، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۶۰ میکرو مولار از هر dNTP، ۱ واحد Taq polymerase (مسترمیکس 2x آماده شرکت آمپلیکون) ، ۱ µl (۱۰ پیکومول) پرایمر ITS1F (5'GCAGCTGGATCATTTTCC3') ، ۱ µl (۱۰ پیکومول) پرایمر ITS2R4 (5'ATATGCAGAAGAGAGGAGGC3') (۱۶) و ۱/۵-5 µl (10 نانوگرم در میکرولیتر) DNA استخراج شده از نمونه ها، انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf در میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتر با پروتکل دمایی زیر انکوبه شد: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۷ سیکل که هر سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. پس از آخرین چرخه ، طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه ادامه یافت و سپس در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (پرویزی و همکاران ۲۰۰۵ با اصلاح جزئی) برای رسیدن به دمای بهینه اتصال، پس از چندین بار افزایش دمای annealing (هر بار نیم درجه) با پرایمرهای مورد مطالعه و مشاهده نتایج PCR به دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی گراد رسیدیم. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شد ژل ها با رنگ بی خطر safe-stain شرکت پیشگام بیوتک رنگامیزی شدند و نتایج در معرض نور ماوراء بنفش مشاهده و ثبت گردید. تکثیر PCR برای ناحیه (ITS1) با استفاده از پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 انجام شده و به عنوان کنترل مثبت از DNA استخراج شده از انگل *L. infantum* با کد شناسایی (Lon 49) که از بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود و برای کنترل منفی از آب مقطر مخصوص PCR که هیچ آلودگی DNA یی نداشت استفاده شد. (۱۵, ۱۶).

حداقل میزان تشخیص (LOD) آزمون پس از تهیه یک سریال رقت از کنترل مثبت (انگل جدا شده و شمارش شده از محیط کشت) در بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران، و انجام PCR بر روی این رقت ها، تعیین شد. محصولات PCR به طور مستقیم با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA با استفاده از پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 ، توالی یابی شدند(شرکت پیشگام بیوتک ، تهران ، ایران). هر توالی بطور جداگانه با توالی های گونه های ثبت شده در GenBank با استفاده از نرم افزار Sequencher v.4.1.4 ، مقایسه و ویرایش شد. درخت فیلوژنتیکی مدل Maximum likelihood (حداکثر احتمال) بوسیله نرم افزار MEGA 7 برای نشان دادن موقعیت فیلوژنتیکی بر اساس مدل Kimura 2-parameter رسم شد.

نتایج

از ۳۱ سگ نمونه برداری شده ، ۲ قلاده (۷٪) کمتر از ۵ سال ، ۱۱ قلاده (۳۵٪) بین ۵ تا ۱۰ سال و ۱۸ قلاده (۵۸٪) بزرگتر از ۱۰ سال بودند (جدول ۱ و نمودار ۱).



نمودار ۱- فراوانی نسبی آلودگی لیشمانیایی در سگ های آلوده شهرستان مشکین شهر استان اردبیل بر اساس گروه سنی جامعه آماری به سه گروه سنی تقسیم شده که نسبت هر کدام به کل جمعیت و میزان آلودگی آنها مشخص است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات سگ ها (سن و جنس) ، فراوانی آلودگی در آنها به روش PCR استاندارد بر حسب شهر و روستا در استان اردبیل

شهرستان	روستا	تعداد سگ نمونه برداری شده (٪)	شماره نمونه	سن	جنس	سگ های آلوده	PCR و توالی یابی	تعداد کل مثبت (٪)
مشکین شهر	بالوجه	۱۵(۴۸,۴)	M01	٤ سال	نر			٪۲۲/٦
			M02	۳ سال	نر	*	+Ve	
			M03	٦ سال	نر	*	+Ve	
			M04	۸ سال	نر	*	+Ve	
			M05	۸ سال	نر			
			M06	۱۰ سال	نر			
			M07	۳ ماه	نر			
			M08	۳ ماه	نر			
			M09	۳ ماه	نر	*	+Ve	
			M10	٦ سال	نر			
			M11	٤ سال	ماده	*	+Ve	
			M12	٤ سال	ماده	*	+Ve	
			M13	۱ سال	نر	*	+Ve	
			M14	۹ ماه	ماده			
			M15	٦ سال	ماده			
			M16	۳ سال	نر	*	+Ve	
			M17	٤/٥ سال	نر	*	+Ve	
	احمدآباد	۱۰(۳۲,۲)	M18	٤ سال	نر			٪۹/۷
			M19	٤ سال	نر			
			M20	۱ سال	ماده			

www.SID.ir

Archive of SID

		M21	٦ سال	نر				
		M22	٥ سال	نر				
		M23	٤ سال	ماده				
		M30	٧ سال	نر				
		M31	١٠ سال	ماده	*	+Ve		
		M24	٨ سال	نر				
		M25	٦ سال	نر				
		M26	١ سال	نر				
پریخان	٦(١٩,٤)							٪٣/٢
		M27	٦ ماه	نر				
		M28	١ سال	نر				
		M29	٤ سال	نر	*	+Ve		
تعداد کل	٣١		٣١		١١/٣١	١١	٪٣٥/٥ (١١/٣١)	

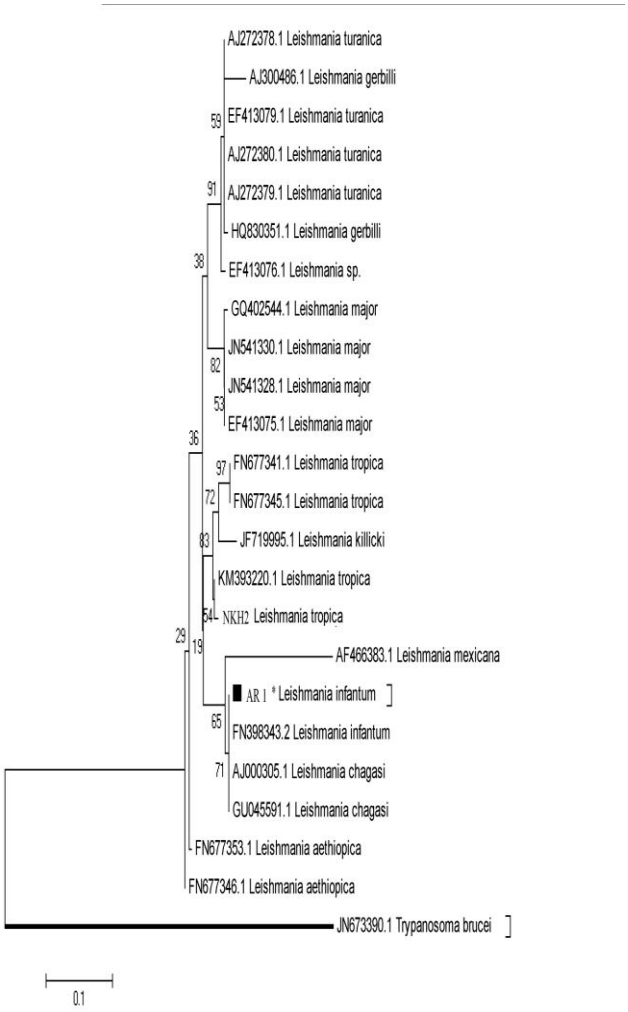
قطعه ٤٨٠ جفت باز برای شناسایی گونه لیشمانیا با موفقیت تکثیر شد. ٣١/١١ قلاده (٣٥/٥٪) سگ بدون علامت به انگل لیشمانیا آلوده بودند. با توجه به اینکه تمام نمونه های مثبت، یک باند ٤٨٠ جفت بازی بر روی ژل آگارز نشان دادند.

نگاره ٢: تصویر نتیجه الکتروفورز محصول PCR با ژن ITS-rDNA قطعه ٤٨٠ جفت بازی در نمونه های مثبت قابل مشاهده است. نمونه ١ کنترل منفی، نمونه ٢ کنترل مثبت و نمونه های ٣ الی ٧ نمونه های سگ های مشکین شهر می باشند.

کلیه ١١ نمونه سگ آلوده توالی یابی و آنالیز شد. درخت فیلوژنیک با استفاده از توالی های ویرایش شده نمونه های اردبیل و توالی های ثبت شده در GenBank از جمله " " FN398343.2 به عنوان " *L.infantum* " ، " " EF413075.1 به عنوان" *L.major* "و *Trypanosoma brucei* با شماره دسترسی" JN673390.1 " برای گروه خارجی رسم شد. بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، تمامی ١١ سگ به طور قطع آلوده به *L. infantum* بوده که توالی آنها با توالی *L. infantum* ثبت شده در GenBank همخوانی داشت (نگاره ٢). ٨ مورد از آنها کمتر از ٥ سال (٢٥٪/٨) ، ٢ مورد بین ٥ تا ١٠ سال (٦/٢٪) و یک مورد بالای ١٠ سال (٣/٢٪) بودند (جدول ١). از این تعداد ٣ مورد (٩/٦٪) ماده و ٨ مورد (٢٥/٩٪) نر بودند.

www.SID.ir

Archive of SID



نگاره ۳: درخت فایلوژنتیک نمونه *لیشمانیا اینفانتوم* جدا شده از شهرستان مشکین شهر با استفاده از ژن ITS-rDNA . تریپانوزوما بروسئی به عنوان خارج گروه درنظر گرفته شده است. نمونه ای که با مربع مشکی مشخص شده، مربوط به نمونه جدا شده از استان اردبیل و مابقی مربوط به نمونه های استاندارد تهیه شده از بانک جهانی ژن می باشد.

بحث

تا کنون بیشترین تحقیقات مربوط به سگ های دارای علائم بالینی و با روش های سرولوژیک بودند. حتی استفاده از روش های مولکولی در بعضی از تحقیقات برای سگ های علامت دار و سرم مثبت بود. همچنین بیشتر این مطالعات بر روی نمونه های طحال و مغز استخوان بوده که منجر به مرگ حیوان می گردید(۱۷). حجاران و همکاران در دو مطالعه جداگانه در سالهای ۲۰۰۷ و ۲۰۱۳ لیشمانیا تروپیکا را از سگ های ایرانی در مناطق اندمیک VL جدا کردند. Baneth و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ لیشمانیا تروپیکا و حتی لیشمانیا میجر را از سگ های آلوده در اطراف فلسطین گزارش نمودند. مطالعه نمایانگر این مسئله است که آلودگی تروپیکایی معمولاً باعث ایجاد زخم های پوستی، درماتیت، تورم طحال و تورم غدد لنفاوی می شود که مشابه علائم لیشمانیازیس جلدی-احشایی سگ که توسط لیشمانیا اینفانتوم ایجاد می شود، می باشد. گرچه آلودگی لیشمانیا میجر همانند موارد انسانی تنها باعث لیشمانیازیس جلدی می شود، لیشمانیا تروپیکا می تواند در لیشمانیازیس احشایی انسانی نقش داشته باشد(۳و۱۰).

اهالی روستاهای مشکین شهر عموماً گله دار بوده و گله های گوسفند و گاو آنها به همراه سگ های گله در مجاورت مناطق مسکونی و پناهگاه ها نگهداری می شوند. از طرف دیگر خانه ها و طویله ها از خاک رس ساخته شده که محیط مناسبی برای تکثیر و زندگی پشه خاکی ها است. همچنین سگهای گله همیشه در طول روز و شب در بیرون از منزل نگهداری می شدند. بیشتر سگها بدون علامت بوده و در شرایط مطلوب VL ، مخزن بالقوه این بیماری به شمار آمده و باعث شیوع بیماری می شدند. علاوه بر این ، حتی اگر سگها دارای علائم بالینی بودند به دلیل عدم آگاهی از CVL ، عوامل پیشگیرانه ، انتقال و درمان بیماری ، صاحبان آنها اقدامی مؤثر انجام نمی دادند. معمولاً سگهای ماده به همراه گله به مراتع ها فرستاده می شوند و حتی اگر توسط گزش پشه خاکی آلوده نشوند، می توانند از طریق جفت گیری با یک سگ نر آلوده، آلوده شوند و این باعث افزایش جمعیت سگهای آلوده بدون علامت می شود(۵). اگرچه مغز استخوان و غدد لنفاوی دارای بار انگلی زیادی هستند، اما طبق مطالعات انجام شده، خون هم برای مطالعات مولکولی

www.SID.ir

Archive of SID

قابل اطمینان و مناسب است. علاوه بر این ، این روش غیر تهاجمی و اخلاقی است و حیوان کمتر مورد آزار و اذیت قرار می گیرد و درنهایت زنده می ماند (۱۸). سگهای آلوده به *لیشمانیا* قابل درمان بوده و پیگیری های پس از درمان نیز برای آنها امکانپذیر است (٤).همچنین اقدامات پیشگیرانه VL برای کاهش خطر آلودگی موثر است.

با به کارگیری ژن ITS-rDNA، که از حساسیت و –ویژگی بالایی برخوردار است (١٦) تقریباً ۳۵٪ (۱۱نمونه) از سگهای نمونه برداری شده، آلوده به *L. infantum* بوده که مهمترین و شناخته شده ترین عامل VL در سگها است (۱۹). در این مطالعه، براساس نتایج و توالی یابی، *L. infantum* به عنوان عامل VL در استان اردبیل بطور قطعی تأیید شد که توالی مربوط به این انگل با هاپلوتایپ ثبت شده توسط سانتوس–الیویرا و همکاران در سال ۲۰۱۱ قرابت بالایی دارد(۲۰). در بسیاری از موارد کشت انگل و آزمون های سرولوژیکی برای یافتن آلودگی لیشمانیایی ممکن است منفی باشد بنابراین طراحی و توسعه روش های مختلف مولکولی از جمله PCR جهت تشخیص قطعی گونه های انگل *لیشمانیا* در نمونه های خون حائز اهمیت است(۲۱ و ٢٤). برای پیشگیری و کنترل CVL چندین استراتژی ارائه شده است. استفاده از محصولات حشره کش (مانند دلتامترین ، پرمترین ، فلومترین ، فیپرونیل) می تواند در جلوگیری از آلودگی لیشمانیایی مفید باشد، اما در ایران استفاده از قلاده های آغشته به حشره کش ها می تواند مؤثرتر باشد و می تواند بیماری در سگ ها را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. زیرا کشتن سگهای به ظاهرسالم و سرم مثبت (بی علامت) جهت کنترل بیماری، هم غیر اخلاقی است و هم برنامه های کنترل را مختل کرده و اثر آنها را کاهش می دهد(۲۲). مطالعات نشان داده که آزاد سازی دلتامترین از قلاده های اسکالیبور باعث کاهش خونخواری در پشه خاکی ها تا ۹۰٪ شده و میزان مرگ و میر پشه خاکی های خون خورده ۳۵٪ –۱۰۰٪ افزایش می یابد. این یافته ها حاکی از آن است که استفاده از قلاده های اسکالیبور هنگام مواجهه با خونخواری پشه خاکی ها، ٩٤ تا ۹۸ درصد بطور سالیانه محافظت ایجاد می کند(۲۳). این مطالعه، حاکی از حضور قطعی بیماری CVL در منطقه و نشان دهنده پراکندگی آلودگی لیشمانیایی در سگهای بدون علامت این منطقه اندمیک در شمال غرب ایران می باشد. بر اساس این مطالعه انگل *لیشمانیا اینفانتوم* با استفاده از قطعه ٤٨٠ جفت بازی از ژن ITS-rDNA و با کمک آنالیزهای فیلوژنتیکی بطور قطعی شناسایی و توالی یابی شد. یافته های ما نشان می دهد که روش نمونه گیری غیر تهاجمی نسبت به نمونه گیری از غدد لنفاوی، مغز استخوان و طحال برای شناسایی VL قابل اعتماد و مناسب هستند. همچنین به دلیل عدم آسیب حیوان، در تحقیقات میدانی، صاحبان این سگ ها همکاری بیشتری با تیم تحقیقاتی خواهند داشت. میزان شیوع VL در سگ های بدون علامت نشان دهنده یک هشدار برای بررسی و نظارت بر افراد / مخازن حساس در منطقه است.

فهرست منابع

1. Taslimian R, Shemshadi B, Spotin A, Ardakani RF, Parvizi P. Molecular Characterization of Visceral Leishmaniasis in Asymptomatic Dogs in North Khorasan, Northeastern Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2019;12(12):1-8.
2. Mohebali M, Moradi-Asl E, Rassi Y. Geographic distribution and spatial analysis of Leishmania infantum infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review. Journal of vector borne diseases. 2018;55(3):173-83.
3. Hajjaran H, Mohebali M, Mamishi S, Vasigheh F, Oshaghi MA, Naddaf SR, et al. Molecular identification and polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

determination of cutaneous and visceral leishmaniasis agents isolated from human and animal hosts in Iran. BioMed research international. 2013;2013.
4. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miro G. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. PLoS neglected tropical diseases. 2018;12(1):e0006082.
5. Monteiro FM, Machado AS, Rocha-Silva F, Assunção CB, Graciele-Melo C, Costa LE, et al. Canine visceral leishmaniasis: detection of Leishmania spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). Microbial pathogenesis. 2019;126:263-8.
6. Mody RM, Lakhal-Naouar I, Sherwood JE, Koles NL, Shaw D, Bigley DP, et al. Asymptomatic Visceral Leishmania infantum Infection in US Soldiers Deployed to Iraq. Clinical Infectious Diseases. 2018;68(12):2036-44.
7. Abdinia B, Oliaei-Motlagh M, Teimouri-Dereshki A. Pediatric visceral leishmaniasis in northwest of Iran. Medicine. 2016;95(44):e5261.
8. Velez R, Ballart C, Domenech E, Abras A, Fernández-Arévalo A, Gómez S, et al. Seroprevalence of canine Leishmania infantum infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. Preventive veterinary medicine. 2019;162:67-75.
9. Abbaszadeh-Afshar Mj, Sharifi I, Bamorovat M, Mohebali M, Bahreini MS, Naderi A. Canine Visceral Leishmaniasis; A Seroepidemiological Survey in Jiroft District, Southern Kerman Province, Southeastern Iran in 2015. Iranian journal of parasitology. 2018;13(1):67-71.
10. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis–new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in parasitology. 2008;24(7):324-30.
11. Herrera G, Higuera A, Patiño LH, Ayala MS, Ramírez JD. Description of Leishmania species among dogs and humans in Colombian Visceral Leishmaniasis outbreaks. Infection, Genetics and Evolution. 2018;64:135-8.
12. Teimouri A, Mohebali M, Kazemirad E, Hajjaran H. Molecular Identification of Agents of Human Cutaneous Leishmaniasis and Canine Visceral Leishmaniasis in Different Areas of Iran Using Internal Transcribed Spacer 1 PCR-RFLP. Journal of arthropod-borne diseases. 2018;12(2):162-71.
13. Aschar M, de Oliveira ETB, Laurenti MD, Marcondes M, Tolezano JE, Hiramoto RM, et al. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with Leishmania infantum. Veterinary parasitology. 2016;225:108-13.
14. Helsinki. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. Bulletin of the World Health Organization. 2001;79(4):373.
15. Parvizi P, Mauricio I, Aransay A, Miles M, Ready P. First detection of Leishmania major in peridomestic Phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta tropica. 2005;93(1):75-83.
16. Parvizi P, Ready P. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health. 2008;13(9):1159-71.
17. Mohebali M, Arzamani K, Zarei Z, Akhoundi B, Hajjaran H, Raeghi S, et al. Canine visceral leishmaniasis in wild canines (fox, jackal, and wolf) in northeastern Iran using parasitological, serological, and molecular methods. Journal of arthropod-borne diseases. 2016;10(4):538-45. 28032106.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Leite RS, de Almeida Ferreira S, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade ASR. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Veterinary parasitology. 2010;170(3-4):201-6.
19. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Advances in parasitology. 2004;57(3):1-88.
20. Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LH, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CB, et al. Atypical Lesions as a Sign of Cutaneous Dissemination of Visceral Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus–Positive Patient Simultaneously Infected by Two Viscerotropic Leishmania Species. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2011;85(1):55-9.
21. Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. Canine leishmaniosis caused by Leishmania major and Leishmania tropica: comparative findings and serology. Parasites & vectors. 2017;10(1):113.
22. Costa DN, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(8):e2355.
23. Courtenay O, Bazmani A, Parvizi P, Ready PD, Cameron MM. Insecticide–impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmaniasis under operational conditions in NW Iran: A community–wide cluster randomised trial. PLoS neglected tropical diseases. 2019;13(3):e0007193.
24. Molaei S, Dalimi A, Mohebali M, Zareii Z, Mohamadi B, Akhondi B et al . Study of Canine Visceral Leishmaniasis in Symptomatic and Asymptomatic Domestic Dogs in Meshkinshahr City, Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2016; 16 (1) :105-115

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir