

تشخیص مولکولی لیثمانیوز در سگ با استفاده از نمونه‌های سواب چشمی و بافی کوت خون

محمد رضا 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)

چکیده

روش‌های مولکولی زیادی جهت تشخیص لیثمانیوز 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 لیثمانیوز 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 بافی کوت 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 بافی کوت استخراج شده و جهت تعیین گونه‌های لیثمانیا 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 بافی کوت مربوط به گروه اول آلودگی به لیثمانیا *ایفانتوم* تعیین گردید. همچنین در نمونه اخیر، اجسام لیثمن در گسترش رنگ‌آمیزی شده مشاهده گردید. بر اساس نتایج مولکولی و تعیین توالی به‌دست آمده نتیجه‌گیری شد که لیثمانیا *ایفانتوم* در بین سگ‌های مشهد شایع بوده و همچنین نمونه‌های سواب چشمی می‌تواند به عنوان یک روش نمونه‌برداری غیرتهاجمی مناسب برای آزمایش مولکولی تشخیص لیثمانیا در سگ مورد استفاده قرار گیرد.

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

مقدمه

لیشمانیا به‌عنوان تک‌یاخته نسجی از اهمیت بهداشتی بالایی در پزشکی و دامپزشکی برخوردار است. این انگل به‌وسیله پشه‌های خاکی فلوتومینه از جنس‌های فلوتوموس و لوتزما (به ترتیب در دنیای قدیم و دنیای جدید) به میزبان‌های حساس منتقل می‌شود (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 کارایی 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 قرار گرفته‌اند (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

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 ۱۳ قلاده، دوبرمن ۵ قلاده، تریر 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 سواب چشمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش PCR نگهداری شدند.

بوده و بدون درد انجام شده و توسط صاحب سگ آسان‌تر مورد پذیرش قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که به‌علت وجود لیسمانیا در ملتحمه چشم سگ‌های بیمار، نمونه‌های به‌دست آمده از ملتحمه چشم منبع خوبی برای استخراج DNA لیسمانیا هستند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2008; de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). لیسمانیا 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 لیسمانیوز 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 لیسمانیازیس در سگ با روش PCR از خود نشان داده‌اند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). با توجه به اهمیت تشخیص لیسمانیوز احشایی در سگ، هدف این مطالعه بررسی کارایی استفاده از روش نمونه‌برداری از ملتحمه چشم و مقایسه با نمونه بافی‌کوت از خون برای تشخیص مولکولی لیسمانیا، 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،



شکل ۱- روش نمونه برداری از چشم سگ با استفاده از سواب

کوت و نمونه های چشمی با متد لاجاد و همکاران با استفاده از پرایمرهای RV1 و RV2 مورد آزمایش قرار گرفتند (Lachaud *et al.*, 2002). نمونه های مثبت واجد باند قابل رویت 145 bp می باشند. در مرحله دوم نمونه های مثبت در آزمایش اولیه، جهت تشخیص مولکولی گونه های لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا مائور 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 نمونه های کنترل منفی و مثبت استفاده شد. باند حاصل برای لیشمانیا اینفانتوم ۷۲۰ جفت باز، برای لیشمانیا تروپیکا ۷۶۰ جفت باز و برای لیشمانیا مائور ۶۵۰ جفت باز می باشد.

تعیین توالی

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

آزمایش انگل شناسی

در آزمایشگاه انگل شناسی، ابتدا گسترش های نسجی با متانول تثبیت و با رنگ گیمسای ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی گردیدند، سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و عدسی شیئی ۴۰x و ۱۰۰x اقدام به جستجوی اجسام لیشمن شد.

استخراج DNA و آزمایش PCR

DNA بافی کوت 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، نمونه های DNA تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شدند.

آزمایش PCR جهت تشخیص گونه های لیشمانیا در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول برای تعیین جنس لیشمانیا، نمونه های DNA استخراج شده از بافی-

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 ۴ نمونه سواب چشمی در گروه سوم (سگ‌های ولگرد) بودند (شکل ۲).

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

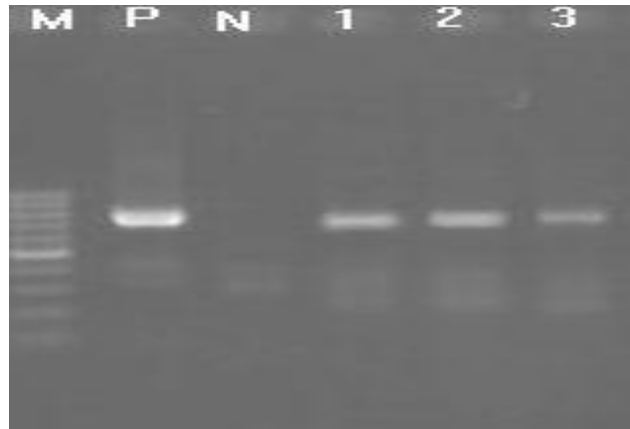


شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی جنس لیشمانیا (نمونه‌ها روی ژل آگارز (۲٪) رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید). M: باند حاصل از Ladder 100. P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی. در شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ نمونه‌های ۱-۳ مثبت می‌باشند و نمونه‌های ۴-۵ از نظر وجود لیشمانیا منفی هستند (باندهای ۱۴۵ bp نشان‌دهنده وجود جنس لیشمانیا می‌باشد).

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.

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 سواب چشمی صورت



شکل ۳- نتیجه الکتروفورز محصول Semi-nested PCR جهت شناسایی گونه‌های لیشمانیا (نمونه‌ها روی ژل آگارز (۲٪) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید). M: باند حاصل از 100 bp Ladder. P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی. شماره‌های ۱، ۲، ۳ نمونه‌های نشان‌دهنده وجود لیشمانیا/ اینفاتوم با باند 720 bp می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

محققین سعی و تلاش در نمونه‌برداری از بافت‌ها به صورت 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 به دست آمده از ملتحمه چشم منبع خوبی برای استخراج DNA لیشمانیا هستند و نتایج PCR به دست 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.*, 2008).

نمونه سواب تهیه شده از ملتحمه چشم به طور 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

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 به خصوص هنگامی که تعداد انگل در بافت کم است، برخوردار است (Srividya *et al.*, 2007). به همین دلیل، امروزه روش PCR به علت 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.*, 2004; Strauss *et al.*, 2012).

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

آمده با سایر مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در بین سگ‌های ایران (Mohebbali *et al.*, 2005; Mohebbali *et al.*, 2011; Haddadzade *et al.*, 2013; Hosseinijad *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 (Mohebbali *et al.*, 2011; Mohebbali *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.

داد که نمونه‌های سواب چشمی (۵ نمونه) در مقایسه با بافی کوت خون (۱ نمونه) در تشخیص لیشمانیازیس سگ با روش مولکولی کارایی بیشتری دارند. در مطالعه‌ای مشابه در برزیل نیز نمونه‌های سواب چشم و بافی کوت را برای تشخیص مولکولی 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 بافی کوت جمع‌آوری شدند. پس از انجام آزمایش‌های مولکولی، میزان آلودگی در نمونه‌های سواب چشمی گروه یک و دو به ترتیب ۷۳/۹ درصد و ۵۲/۲ درصد برآورد شد، در حالی که این میزان آلودگی در نمونه‌های بافی کوت این دو گروه به ترتیب ۱۳ درصد و ۳۰/۴ درصد بودند (de Almeida Ferreira *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر *لیشمانیا اینفانتوم* به عنوان تنها گونه آلوده‌کننده ۲۰ درصد سگ‌های ولگرد و ۵ درصد سگ‌های خانگی دارای نشانه بالینی، تشخیص داده شد. نتایج به‌دست

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.

- 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., Mohebalı, M., Akhoundi, B. and 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.
- 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.
- Hosseinejad, M., Mohebalı, 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 diagnosis of 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., Capri, 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 leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 125: 251-262.
- Mohebalı, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, Sh., Zarei, Z., *et al.* (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology*, 129: 243-251.
- Mohebalı, 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. *Iranian Journal of Parasitology*, 2: 69-73.
- Moshfe, A., Mohebalı, 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., Kakoei, 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., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., *et al.* (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 165: 1-18.

-
- 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.

Molecular detection of canine Leishmaniasis using conjunctival swab and buffy coat samples

Arainnejad, M.R.¹, Razmi, G.R.^{2*}, Khoshnegah, J.³

1- Graduate of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding author email: razmi@um.ac.ir

(Received: 2015/11/8 Accepted: 2016/1/30)

Abstract

Many molecular methods have been used for diagnose is of canine leishmaniasis. These methods mainly rely on tissue specimens provided by invasive approaches for molecular detection of leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate two noninvasive sampling methods detection of Leishmaniasis using PCR method. For this purpose, a total of 60 dogs were selected and equally divided into three groups: pet dogs with cutaneous lesions (Group 1); pet dogs without cutaneous lesions (Group 2) and stray dogs (Group 3). After physical examination of dogs, eye swab and buffy coat samples were collected from each dog, also, tissue smears were prepared from the lesions of dogs in group 1. DNA of eye swab and buffy coat samples were extracted and used to detection of Leishmania species using PCR and semi-nested PCR tests. Blood smears were stained by Giemsa method for microscopic evaluation. Out of 60 dog, the DNA of four swab samples related to the dogs of Group3 and one swab and DNA of buffy coat sample in a dog in group 1 was infected with Leishmania infantum. Leishman bodies was only observed in tissue smear of one dog in group 1. Three positive samples were sequenced for confirmation of results. Based on the results of this study, Leishmania infantum infection is common among dogs in Mashhad area and it seems that ocular swab specimens can be used as a noninvasive method for molecular detection of leishmania infection in dogs.

Key words: Leishmania, Eye swab, Buffy coat, Molecular methods, Dog.