جداسازی و تعیین انگل لیشمانیا با استفاده از روش های متداول و تکنیک های مولکولی از مخازن لیشمانیازیس جلدی در شهرستان اصفهان

اسد میرزائی[۱*]، سهیلا روحانی[۲]، پرویز پرویزی[۳]، محمدرضا محمودی[۴]

۱) گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۳) آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، گروه انگل شناسی، انستیتو تحقیقاتی پاستور ایران

۴) گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۷

چکیده

مقدمه: بیماری لیشمانیوز یکی از شش بیماری مهم گرمسیری است که سازمان بهداشت جهانی مطالعه و انجام تحقیقات درباره جنبه های مختلف آن را توصیه کرده و مورد حمایت قرار داده است. لیشمانیوز جلدی از جمله بیماری های انگلی بومی ایران است و استان اصفهان یکی از مهم ترین کانون های آن در ایران می باشد. این مطالعه به منظور بررسی وضعیت انگل لیشمانیا در جوندگان شهرستان اصفهان صورت گرفت.

مواد و روش ها: برای صید مخازن از تله های زنده گیر استفاده شد. بعد از تعیین گونه، به روش سمباده زنی، از گوش های جوندگان سروزیته تهیه شد و در محیط کشت NNN و قاعده دم Balb/C تلقیح شد. هم چنین پس از فیکس در لام وجود جسم لیشمن با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. با روش ISH_Horovize از گوش های جوندگان DNA استخراج، با Nested-PCR ژن ITS-RDNA انگل لیشمانیا تکثیر و ارزیابی شد.

یافته های پژوهش: ۵۰ سر جونده از ۴ روستا در شهرستان اصفهان صید شد که ۴۰ سر رومبومیس اپیموس و ۱۰ سر مریونس لیبیکوس بودند. آلودگی لیشمانیایی در آزمایشات متداول(لام مستقیم، تزریق به Balb/C و در محیط کشت)(۵۷ درصد) در گونه های رومبومبس اپیموس و مریونس لیبیکوس مشاهده گردید. وجود انگل لیشمانیا ماژور در این جوندگان به روش مولکولی(۵۴ درصد) تایید شد. نتایج تعیین توالی گونه ها وجود دو هاپلوتایپ متفاوت از لیشمانیا ماژور در جوندگان منطقه را ثابت کرد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به یافته ها و وفور بالای جونده رومبومیس اپیموس و آلودگی بیشتر این جونده میزبان مخزن اصلی لیشمانیا میجر در استان اصفهان است. مریونس لیبیکوس دومین مخزن ZCL و استان اصفهان یکی از کانون های لیشمانیازیس در ایران است.

واژه های کلیدی: لیشمانیا، رومبومیس اپیموس، مریونس لیبیکوس، Nested-PCR

* **نویسنده مسئول**: گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: amirzaeii@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

مقدمه

لیشمانیازیس جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور یک معضل بهداشت عمومی در خیلی از مناطق دنیای قدیم و به خصوص منطقه مدیترانه شرقی است و در ۱۴ کشور موجود در منطقه مدیترانه شرقی حداقل یک تا سه فرم از بیماری لیشمانیازیس وجود دارد،(۱،۲). لیشمانیا ماژور در میان جمعیت های زیادی از جوندگان در بسیاری از مناطق خشک و نیمه خشک به طور وسیعی شایع می باشد،(۳). جوندگان به عنوان مهم ترین مخزن مهره دار لیشمانیازیس جلدی روستائی نقش مهمی در چرخه انتقال طبیعی و همه گیری بیماری دارند.(۴)

بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۶، لیشمانیازیس جلدی در ۸۸ کشور جهان اندمیک بوده و حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به آن هستند و شیوع آن در جهان در حدود ۱۲ میلیون نفر و بروز آن ۱/۵ میلیون نفر در سال می باشد. لیشمانیازیس جلدی در تمام کشورها به جز استرالیا و اقیانوس منجمد شمالی گزارش شده است اما بیشتر موارد بیماری مربوط به کشورهای ایران، افغانستان، الجزایر، سوریه، عربستان، پرو و برزیل می باشد.(۵)

جوندگان متعلق به زیر خانواده جربیلینه مهم ترین میزبان مخزن لیشمانیازیس جلدی روستائی در ایران و بعضی دیگر از کشورها هستند،(۳،۶،۷). این بیماری در بیش از ۲۰ استان ایران شایع است. اولین مطالعه در مورد مخازن لیشمانیازیس جلدی در سال۱۹۵۰ توسط انصاری و مفیدی در ترکمن صحرا و بعد از آن توسط انصاری و فقیه(۱۹۵۳) در سرخس انجام گرفت.(۸،۹)

گونه های مختلفی از لیشمانیا مسئول عوارض بالینی مختلف لیشمانیازیس از موارد زخم های جلدی خود بهبود یابنده تا عفونت های کشنده لیشمانیازیس احشائی هستند. در ایران دو فرم از بیماری شامل لیشمانیازیس جلدی و احشائی وجود دارد. هر دوگونه لیشمانیا تروپیکا و ماژور عامل لیشمانیازیس جلدی در مناطق مختلف هستند در حالی که لیشمانیاماژور گونه روستائی است و در مناطق مختلف ایران از جمله شمال،(۱۰)، مرکز،(۱۱)، غرب، جنوب و شرق کشور،(۶)، شایع می باشد.

از ۳۳۷۶۰ مورد گزارش جدید لیشمانیازیس جلدی روستائی توسط سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۸ از ۱۲ کشور منطقه مدیترانه شرقی، ایران با ۱۸۱۷۵ مورد در رتبه اول و از ۶۶۴۸۰ مورد گزارش لیشمانیازیس جلدی شهری، ایران با ۸۶۴۹ مورد گزارش سالانه بعد از سوریه و افغانستان در رتبه سوم قرار دارد.(۱)

گونه های مختلفی از جوندگان در مناطق مختلف ایران به عنوان مخزن لیشمانیازیس جلدی روستائی عمل می کنند. رومبومیس اپیموس و مریونس لیبیکوس در شمال شرق و مرکز ایران، مریونس لیبیکوس و مریونس پرسیکوس در جنوب، مریونس هوریانه در جنوب، تاترا ایندیکا و نزوکیا ایندیکا در غرب و جنوب غرب به عنوان میزبان مخزن عمل می کنند.(۶،۱۲)

تقسیم بندی انگل لیشمانیا بر اساس مشخصات بالینی بیماری آن، بیولوژی، اپیدمیولوژی و ایزوآنزیم ها به گونه های مختلفی صورت گرفته است. ولی با توجه با عدم کارائی مناسب روش های فوق در تاکسونومی این انگل و مشکلاتی که در تاکسونومی با استفاده از ایزوآنزیم ها به خاطر وقت گیر بودن، گران بودن، تعداد زیاد ایزوآنزیم ها و مشکلات تکنیکی وجود دارد بهترین روش برای تاکسونومی استفاده از روش های مختلف مولکولی می باشد که به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه و سویه های مختلف انگل در یک دهه گذشته بسیار توسعه یافته اند. این روش ها شامل سکانس کردن کینتوپلاست DNA، rDNA، نوکلئاز DNA و میکروساتلایت ها می باشد. تنوع بین گونه ای و داخل گونه ای بسیار زیادی در ژن های ریبوزومی ITS1/ITS2 در گونه های لیشمانیای دنیای جدید و قدیم مشاهده شده است. با توجه به این مطالب در این مطالعه از ژن ITS1/ITS2 به روش Nested-PCR برای جداسازی، تشخیص و تعیین تنوع ژنتیکی انگل لیشمانیا ماژور از جوندگان میزبان مخزن انگل در شهرستان اصفهان استفاده شد.(۱۳،۱۴)

مواد و روش ها

این مطالعه در روستاهای سجزی، یلنگی، تیمیارت و فساران از توابع شهرستان اصفهان انجام گرفت.(شکل شماره ۱) این منطقه یکی از مهم ترین کانون های اندمیک لیشمانیازیس جلدی در ایران است. نمونه گیری در طی تابستان سال های۱۳۹۰-۱۳۸۹ در چند مرحله انجام گرفت که به این منظور ابتدا اقدام به شناسائی مناطق تجمع جوندگان به عنوان مخزن بیماری و شناسائی کانون های فعال آن ها نموده، سپس با استفاده از تله های چوبی زنده گیر از اطراف این روستاها اقدام به صید جونده گردید.(شکل شماره ۲) در صورت مردن جونده صید شده ابتدا گونه آن بر اساس رنگ و اندازه بدن، گوش ها، دندان ها و دم موش

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

تعیین شده سپس گوش های جونده را با الکل استریل کرده و آن ها را بریده و در میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری حاوی PBS استریل گذاشته و بعد از کدگذاری و ثبت مشخصات، در یخچال نگهداری می شدند. جونده هائی که به صورت زنده صید می شدند به آزمایشگاه منتقل شده و جهت انجام آزمایشات بعدی و نمونه گیری نگهداری می شدند.

در آزمایشگاه ابتدا بر روی جوندگان زنده آزمایشات روتین انجام می گرفت. به این منظور ابتدا جونده را با اتر بیهوش کرده و تحت شرایط استریل به روش سمباده زنی بر روی سطح گوش جونده سروزیته تهیه می شد(شکل شماره ۳) و سروزیته آن توسط تیغ اسکالپل به شیشه ساعت حاوی سرم فیزیولوژی منتقل می شد و مقداری از آن به محیط کشت NNN و حدود ۰/۵ میلی لیتر از آن به صورت زیرجلدی به قاعده دم موش Balb/C تزریق می شد. هم چنین از هر کدام از گوش جوندگان یک عدد لام مستقیم به روش مهری یا لکه ای تهیه می شد و بعد از فیکس کردن با متانول با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شده و با استفاده از عدسی x۱۰۰ از نظر وجود انگل بررسی می شد. محیط کشت های تلقیح شده هر ۷۲ ساعت یک بار و به مدت ۴۵ روز از نظر وجود اشکال پروماستیگوت بررسی شده و نتایج آن ها ثبت می شد. موش هایی که به آن ها تزریق شده نیز به مدت ۶ ماه و هر هفته یک بار از نظر وجود زخم لیشمانیا بررسی و در صورت وجود زخم، از آن نمونه گیری و لام تهیه می شد و یک نمونه نیز کشت داده شده و نتایج آن ها ثبت می شد.

آزمایشات مولکولی

برای انجام آزمایشات مولکولی نیز گوش های جونده را بریده و هر کدام را در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتر PBS قرار داده، سپس ۳ مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ با PBS شستشو داده شدند. سپس نمونه ها را در ازت مایع و بن ماری ۵۶ درجه به صورت متناوب فریز و ذوب می شدند و به روش (IHS_ Grinding mix)HORVIZ بر اساس(Ready 1991) اقدام به استخراج DNA نمونه ها گردید. در نهایت به DNA استخراج شده به میزان ۳۰ میکرولیتر از بافر TAE1X اضافه می شد و نمونه ها جهت انجام آزمایشات مولکولی در یخچال ۲۰- نگهداری می شدند.

تمام نمونه های DNA جهت بررسی وجود لیشمانیا به روش Nested-PCR در دو مرحله و در دو میکروتیوب مجزا انجام می شد،(۱۵). با استفاده از ژن های ITS1,ITS2 و پرایمرهائی که توسط پرویزی و رائدی(۲۰۰۸) طراحی شدند مورد انجام آزمایش قرار گرفتند. در مرحله اول برای ژنITS1 از پرایمر فوروارد (5' IR 1 GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTG GATCATT3') و پرایمر معکوس (5' IR2 GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTC TG 3') و در مرحله دوم آزمایش نیز از پرایمر (TS1F. 5.8S (5 GCAGCTGGATCATTTTCC 3') به عنوان پرایمر فوروارد و از پرایمر (5' ITS2R4 ATATGCAGAA GAGAGG AGGC 3') به عنوان پرایمر معکوس استفاده شد.

شکل شماره ۱. نقشه جغرافیائی استان اصفهان، روستاهای مورد مطالعه و محل صید جوندگان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

شکل شماره ۲. تله گذاری در یک کلنی فعال و حضور جوندگان در اطراف تله ها

شکل شماره ۳. جونده صید شده و نمونه گیری از آن به صورت سمباده زدن گوش حیوان

یافته های پژوهش

در مجموع از ۴ روستای مورد مطالعه از توابع شهرستان اصفهان ۵۰ سر جونده صید شد که ۴۰ سر رومبومیس اپیموس و ۱۰ سر مریونس لیبیکوس بودند. تنها ۷ سر از جوندهائی که به صورت زنده صید شده بودند تا انتقال به آزمایشگاه زنده مانده و آزمایشات روتین بر روی آن ها انجام گرفت.(جدول شماره ۱) آزمایشات متداول فقط بر روی جوندگان زنده و آزمایش های مولکولی بر روی کلیه نمونه های جوندگان صید شده انجام گرفت. جدول شماره ۲ فراوانی جوندگان آلوده صید شده را بر حسب نوع آزمایش به تفکیک مناطق مورد مطالعه نشان می دهد. فراوانی گونه انگل بر حسب مناطق مورد مطالعه در جدول شماره ۳ آمده است. به طور کلی در اصفهان دو گونه جونده رومبومیس اپیموس و مریونس لیبیکوس به عنوان مخزن لیشمانیازیس جلدی روستائی عمل می کنند که میزان آلودگی در آن ها بالا(۵۴ درصد) می باشد.

در جوندگان صید شده، در ۴ مورد یکی از گوش ها آلودگی میکس، یک گوش آلوده به لیشمانیا ماژور و در ۷ مورد هر دو گوش آن ها آلوده به لیشمانیا ماژور و در ۲ جونده نیز هر دو گوش آن آلودگی میکس داشتند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

جدول شماره ۱. تعداد جوندگان صید شده شهرستان اصفهان به تفکیک گونه و منطقه در سال ۹۰-۱۳۸۹

منطقه صید		گونه جونده	رومبومیس اپیموس	مریونس لیبیکوس	مجموع
استان اصفهان	شهرستان اصفهان	سجزی	۱۹	۲	۲۱
		یلنگی	۱۹	–	۱۹
		تیمیارت	–	۶	۶
		فساران	۲	۲	۴
جمع کل			۴۰	۱۰	۵۰

جدول شماره ۲. فراوانی آلودگی در جوندگان صید شده بر حسب نوع آزمایش و مناطق مورد مطالعه شهرستان اصفهان در سال ۹۰-۱۳۸۹

محل صید جونده			تعداد کل نمونه	نوع آزمایش: مولکولی	نوع آزمایش: متداول			
				ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2	تعداد کل نمونه	لام مستقیم	کشت NNN	تزریق به موش آزمایشگاهی
				مثبت	کل	مثبت	مثبت	مثبت
استان اصفهان	شهرستان اصفهان	سجزی	۲۱	۸	۷	۰	۰	۰
		یلنگی	۱۹	۱۲	۷	۲	۰	۰
		تیمیارت	۶	۴	۷	۱	۰	۰
		فساران	۴	۳	۷	۱	۰	۰
		جمع کل	۵۰	۲۷(٪۵۴)	۷	۴(٪۵۷)	۰	۰

جدول شماره ۳. فراوانی گونه انگل بر حسب مناطق مورد مطالعه شهرستان اصفهان در سال۹۰- ۱۳۸۹

محل صید جونده			تعداد کل صید	موارد مثبت ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2	گونه انگل: لیشمانیا ماژور	گونه انگل: آلودگی مخلوط
استان اصفهان	شهرستان اصفهان	سجزی	۲۱	۸	۶	۲
		یلنگی	۱۹	۱۲	۹	۳
		تیمیارت	۶	۴	۳	۱
		فساران	۴	۳	۰	۳
		جمع کل	۵۰	۲۷	۱۸(٪۶۶/۶)	۹(٪۳۳/۳)

بحث و نتیجه گیری

یافته های این تحقیق نشان داد که مخازن لیشمانیازیس جلدی روستایی در منطقه مورد مطالعه، گونه های مختلف جوندگان و مخزن اصلی جونده رومبومیس اپیموس بوده و مریونس لیبیکوس در رده دوم اهمیت قرار داشت. میزان آلودگی در جوندگان منطقه مورد مطالعه ۵۴ درصد بود.

کلیه نمونه ها با استفاده از تکنیک های مولکولی با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA انگل لیشمانیا بررسی شده و موارد مثبت تعیین گونه شدند که نتایج نشان داد که گونه غالب انگل در منطقه مورد مطالعه لیشمانیا ماژور می باشد و مواردی از آن ها هم به صورت آلودگی میکس و نامشخص بودند.

شناسایی گونه های انگل در اتخاذ برنامه های پیشگیری و کنترل بیماری موثر است. به علت تعدد و تشابه شکلی گونه های انگل، رده بندی آن به گونه ها و سویه های متفاوت بسیار مشکل است و شواهد اپیدمیولوژیکی و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

بالینی نیز به تنهایی در افتراق میان گونه ها کارساز نمی باشد.(۱۶)

در گذشته انگل لیشمانیا را تنها بر اساس ظاهر کلینیکی تشخیص نمی دادند بلکه با توجه به الگوی متفاوت اپیدمیولوژی به خاطر تنوع زیاد گونه های لیشمانیا و ناقلین و میزبانان مخزن آن مشخص می شد. ولی امروزه تغییر الگوی اپیدمیولوژی لیشمانیا در مناطق مختلف اندمیک انگل در دنیای قدیم و جدید گزارش می شود. این تغییرات شامل ظهور کانون های جدید اندمیک، گسترش انگل به مناطق جدید، حضور هم زمان چند گونه از انگل لیشمانیا با ظاهر کلینیکی یکسان، تشخیص ارتباطات جدید بین انگل و ناقل، گزارش انتقال انتروپونتیک لیشمانیا اینفانتوم و انتقال زئونوتیک لیشمانیا تروپیکا و گزارش موارد جدیدی از لیشمانیای ناشناخته و طبقه بندی نشده از نمونه لیشمانیای جلدی می باشد.(۱۷،۱۸)

مشاهده ظهور مجدد و گسترش این بیماری در مناطق زیادی از سراسر جهان در ارتباط با سه فاکتور اصلی شامل تغییرات زیست محیطی توسط انسان، ضعف و مشکلات ایمنی و شکست درمان و مقاومت داروئی است،(۱۹). امروزه به نظر می رسد تاکسونومی انگل بر اساس ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی انگل برای درک درست این تغییرات اپیدمیولوژیکی لازم باشد.(۲۰)

معمولاً تشخیص قطعی و اختصاصی گونه های لیشمانیا بستگی به تکثیر DNA و آنالیز توالی آن دارد. تعدادی از جوندگان وحشی معمولاً تعداد بسیار کمی انگل را در خود نگه می دارند که تشخیص آن ها با استفاده از تکنیک های مولکولی بسیار موفق تر از روش های روتین آزمایشگاه است و هم چنین به تشخیص گونه های پشه خاکی ناقل انگل که بر روی میزبان مخزن احتمالی انگل تغذیه می کنند کمک کند.(۱۶،۲۱)

از آن جا که اولین گام در برنامه ریزی جهت کنترل و مبارزه با بیماری، تعیین مشخصات دقیق عامل بیماری است، مطالعات ملکولی که علاوه بر تشخیص، تنوع ژنتیکی بین گونه ای و درون گونه ای جنس لیشمانیا را نشان می دهند، از اهمیت زیادی برخوردارند.(۲۲،۲۳)

در مواردی که در گوش های جوندگان آلودگی به گونه های متفاوت انگل مشاهد می شود احتمال دارد که جونده در معرض گزش دو گونه متفاوت از پشه خاکی های ناقل و یا این که توسط دو پشه از یک گونه که از دو مخزن متفاوت تغذیه کرده باشند مورد گزش قرار گرفته باشد.

به طور کلی رومبومیس اپیموس و مریونس لیبیکوس به عنوان مخازن اصلی لیشمانیا ماژور در ایران گزارش شده اند، اما دیگر جوندگان همانند تاترا ایندیکا، نزوکیا ایندیکا، مریونس هوریانه، مریونس پرسیکوس و گونه های مختلف جربیل به عنوان مخزن لیشمانیا ماژور مورد توجه هستند. از نظر جغرافیائی این جوندگان مخزن در مناطق مختلفی از ایران قرار دارند، به طوری که رومبومیس اپیموس در کانون شمال شرق و مناطقی از مرکز ایران، مریونس لیبیکوس و در مرکز و جنوب غرب ایران، مریونس هوریانه در جنوب شرق ایران و تاترا ایندیکا در جنوب و جنوب غرب، میزبان مخزن انگل می باشند.(۶،۲۱،۲۴)

یعقوبی و ارشادی و همکاران(۱۹۹۶) مریونس لیبیکوس را به عنوان میزبان اصلی لیشمانیا ماژور در شهرستان بادرود استان اصفهان معرفی کرده اند.(۲۵)

اخوان و همکارن(۲۰۱۰a) در مطالعه ای که بر روی ۵۸ سر رومبومیس اپیموس صید شده از اصفهان انجام دادند، توانستند با روش تهیه لام مستقیم آلودگی را در ۲۴/۱ درصد جوندگان و با روش Nested-PCR و تکثیر ژن ITS2-rDNA، آلودگی را در ۵۸/۶ درصد از جوندگان صید شده تشخیص دهند. در این مطالعه هم زمان سه گونه لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی را از جونده رومبومیس اپیموس جدا کردند و بیشترین آلودگی در جوندگان، گونه لیشمانیا تورانیکا بود.(۲۴)

اخوان و همکاران(۲۰۱۰b) مطالعه ای را بر اساس تکثیر ژن ITS1 به روش Nested PCR در استان اصفهان طراحی نمودند. نتایج نشان داد که ۲۱ سر از ۹۵ رومبومیس اپیموس صید شده با آزمایش های مستقیم تهیه لام میکروسکوپی و ۴۱ سر از آن ها با روش PCR به انگل لیشمانیا آلوده بودند. میزان آلودگی جوندگان به لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی به ترتیب ۳/۲ درصد، ۲۷/۴ درصد و ۱/۱ درصد بود. عفونت مخلوط با لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تورانیکا ۱۵/۸درصد، با لیشمانیا ماژور و جربیلی ۱/۱درصد و عفونت میکس با هر ۳ گونه ۲/۱ درصد بود.(۲۶)

در مطالعه حاضر در بررسی نتایج تعیین توالی نمونه های لیشمانیا ماژور حداقل ۲ هاپلوتایپ از جوندگان اصفهان جدا شد. نتایج توالی نمونه ها با گونه های رفرانس ثبت شده در Gen Bank مقایسه و بررسی شد که هاپلوتایپ غالب لیشمانیا ماژور در این مطالعه مشابهت کامل با موارد جدا شده از ایران و سودان با شماره رفرنس EF413075, AJ300481, GQ402543, EU482830, EF41307 داشت.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

رائدی و پرویزی(۲۰۰۸) توانستند انگل لیشمانیا ماژور را در سه گونه جونده متفاوت(رومبومیس اپیموس، مریونس لیبیکوس و مریونس پرسیکوس) در استان اصفهان جدا کنند. آن ها با استفاده از ژن ITS و تعیین توالی آن نشان دادند که انگل لیشمانیا ماژور جدا شده از این ۳ گونه جونده یک هاپلوتایپ هستند و از لحاظ ژنتیکی با هم تفاوت ندارند. یک مورد لیشمانیا تروپیکا نیز از مریونس پرسیکوس جدا گردید که اولین مورد گزارش لیشمانیا تروپیکا از جونده مریونس پرسیکوس در این منطقه بود.(۱۴)

Strelkova و همکاران(۱۹۹۰ و ۲۰۰۱)، وضعیت تاکسونومی انگل های لیشمانیا که در موش های صحرائی خانواده جربیلیده، در روسیه، مغولستان و چین ایجاد آلودگی می کنند را مورد آنالیز قرار دادند. یافته های روش های ایزوآنزیم و مولکولی نشان داد که نه فقط یک گونه لیشمانیا بلکه سه گونه لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی با هم به طور طبیعی در جمعیت های جوندگان در روسیه وجود دارد که دو گونه لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی به اشتباه لیشمانیا ماژور تشخیص داده می شد.(۲۷،۲۸)

نتایج این مطالعه نشان داد که میزبانان مخزن در کانون های اندمیک لیشمانیازیس جلدی ایران گونه های متفاوتی از جوندگان هستند که گونه ها و هاپلوتایپ های مختلفی از انگل را در خود نگه می دارند و جونده رومبومیس اپیموس میزبان مخزن اصلی انگل در منطقه بوده و مریونس لیبیکوس در رده دوم اهمیت قرار دارد. هم چنین میزان آلودگی بالای ۵۰ درصد جوندگان در این منطقه ایجاب می کند که تمرکز ویژه ای بر روی برنامه های کنترلی و مبارزه با انگل لیشمانیا و جوندگان مخزن صورت گیرد تا از انتقال انگل به انسان جلوگیری کرده و با قطع چرخه انتقال انگل از موارد ابتلا انسانی جلوگیری شود.

References

1-Postigo JR. Leishmaniasis in the world health organization eastern mediterranean regionn. Int J Antimicrob 2010; 36: S62-S5.

2-Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27:305-18.

3-Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol 2005; 35:1169-80.

4-Hertig M, Fairchild EB, Joihnson CM. Leishmaniasis transmission-reservoir project. Ann Rep Gorgas Mem Lab 1957; 9:9-11.

5-WHO. Expert committee: control of leishmaniasis, technical report series, executive board EB118/4. 118th Session. Provisional agenda item, 5.1, Geneva, Switzerland; 2006

6-Mohebali M, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. East Med Health J 2004; 10:591-9.

7-Strelkova MV. Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis- a review. Folia Parasitol 1996; 43:1-6.

8-Ansari N, Mofidi S. Contribution l'etude des formes humides de leishmaniose cutande, Bull Soc Path Exot 1950; 43: 601-7.

9-Ansari N, Faghih M. Leishmaniose cutane / L. tropica chez Rhombomys opimus. Annb Parasitb Humaine et Compard 1953; 25: 24-6.

10-Tashakori M, Ajary S, Kariminia A, Mahboudi F, Alimohammadian MH. Characterization of Leishmania species and L. major strains in different endemic areas of leishmaniasis in Iran. Iranian Biomed J 2003; 7: 45-50.

11-Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. II. The human disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968a; 62: 534-42.

12-Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Isolation and detection of Leishmania species among naturally infected Rhombomis opimus, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara, North East of Iran. Exp Parasitol 2011; 129: 375-80.

13-Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Schonian G, Farajnia, S, et al. Leishmania major: Genetic heterogenesity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism an sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop 2006; 98: 52-8.

14-Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

from Iranian Foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Trop Med Inter Health J 2008;13:1159-71.

15-Ready PD, Lainson R, Shaw JJ & Souza AA. DNA probes for distinguishing Psychodopygus wellcomei from Psychodopygus complexus (Diptera:Psychodidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1991;86: 41-9.

16-Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96: (Suppl. 1) S1-S250.

17-Schönian G, Kuhls K, Mauricio L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. Parasitology 2011; 138: 405-25.

18-Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, Barghuthy F, et al. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major. Trop Med Int Health 2004; 9: 812-6.

19-Dujardin JC. Risk factors in the spread of Leishmaniases: Towards integerated monitoring. Trend Parasitol 2006; 22: 4-6.

20-Banuls AL, Hide M, Tibayrence M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of Leishmania Parasites. Int J Parasitol 1999; 29: 1137-47.

21-Tashakori M, Al-Jawabreh A, Kuhls K, Schönian G. Multilocus microsatellite typing shows three different genetic clusters of Leishmania major in Iran. Microb Infect Instit Pasteur 2011; 13:937-42.

22-Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: A review. Med Vet Entomol 1990; 4: 1-24.

23-Killick-Kendrick R, Ward RD. Ecology of the Leishmania. Parasitology 1981;82: 143-52.

24-Akhavan AA, Mirhendi, H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P. et al.. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Exp Parasitol 2010a; 126: 552-6.

25-Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Seasonal variation of Leishmania major infection rates in sandflies from rodent burrows in Isfahan province. Iran Med Vet Entomol 1996;10: 181-4.

26-Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Khamesipour A, Mirhendi H, Alimohammadian MH, Rassi Y, et al. Dynamics of Leishmania infection rates in Rhombomys opimus (Rodentia: Gerbillinae) population of an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 2010b; 103: 84-9.

27-Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovsky EN, Dergacheva TI, Evans DA. Mixed leishmanial infections in Rhombomys optimus: a key to the persistence of Leishmania major from one transmission season to the next. Ann Trop Med Parasitol 2001; 95: 811-9.

28-Strelkova MV, Shurkhal AV, Kellina OI, Eliseev, LN, Evans DA, Peters W, et al.. A new species of Leishmania isolated from the great gerbil Rhombomys opimus. Parasitology 1990;101:327-35.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

Isolation and determination of Leishmania parasite in reservoir hosts of Leishmaniasis in Isfahan province using routine laboratory methods and molecular tools

*Mirzaei A *[1], Rouhani S[2], Parvizi P[3], Mahmoudi MR[4]*

(Resived: May 5, 2013 Accepted: November 18, 2013)

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is one of the six important tropical diseases, so that World Health Organization have recommended and supported to study different aspects of the disease. Leishmaniasis is an endemic parasitic disease in Iran and the Isfahan province is a focal region of the disease.

Material & Methods: Rodents of the reservoir hosts were captured by live traps. After identifying the rodent's species, smear samples of their ears were prepared by scratching method. Serous from the rodent's ears were isolated, then, inoculated in NNN medium and inoculated to the susceptible animal. Slides were prepared to find Leishmania using microscope. DNAs were extracted by ISH Horovize method and their genes were amplified by nested PCR and the amplified gene was directly sequenced.

Finding: 50 rodents were trapped from 4 regions under study. Collectively, 40 Rhombomis opimus (R. opimus) and 10 Meriones lybicus(M. lybicus) were trapped. Leishmania infection (57%) was found in R. opimus and M. lybicus using conventional methods (direct smear, inoculation in Balb/C and in NNN medium). Detection of Leishmania major (L. major) (54%) in the rodents was confirmed by molecular methods. Sequencing results of the samples confirmed two different haplotypes of L. major in these rodents.

Discussion & Conclusion: Considering the abundance of R. opimus and the high Leishmania infection in these rodents, it is seemed that R. opimus may be the main reservoir of Leishmania major in Isfahan province, then followed by M. libycus as a second reservoir host of ZCL.

Keywords: Leishmania major, Rhombomis opimus, Meriones lybicus, Nested-PCR, IT-S-rDNA

1. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Science, Ilam, Iran.
2. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran.
3.Molecular systematic Lab. Dept of Parasitology, Pasteure Institute of Iran, Tehran, Iran.
4. Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Science, Rasht, Iran
**Corespond authores*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]