مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ تابستان ۱۳۹۰/ ۷۶-۶۶

بررسی فون جوندگان (Muridae: Gerbillinae) و تعیین مخازن بیماری لیشمانیوز پوستی با روش Nested-PCR در شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷

کوروش عزیزی[۱]، بهروز داوری[۲]، محسن کلانتری[۳]، سجاد فکری[۴]

۱- دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان و مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۴-۷۲۵۱۰۰۱-۰۷۱۱ azizik@sums.ac.ir

۲- استادیار، گروه قارچ و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۳- کارشناس ارشد گروه قارچ و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- کارشناس مبارزه با بیماریها، مرکز بهداشت شهرستان جاسک، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، جاسک، ایران

چکیده

زمینه و هدف: جوندگان دم جارویی (Rodentia: Muridae: Gerbillinae) مهمترین میزبانان مخزن انگل عامل بیماری لیشمانیوز جلدی مرطوب (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis=ZCL) یعنی *Leishmania major* می‌باشند. در مناطق مختلف کشور گونه‌های متفاوتی از این جوندگان در نگهداری انگل نقش دارند. از آنجا که شهرستان جاسک در حال حاضر مهمترین کانون اندمیک این بیماری در استان هرمزگان و جنوب شرقی کشور محسوب می‌گردد، مطالعه حاضر بمنظور آگاهی از گونه‌های جوندگان این شهرستان و تعیین گونه‌های مخزن انگل طراحی و اجرا گردید.

روش بررسی: در مطالعه‌ای توصیفی در سال ۱۳۸۷، جوندگان از مناطق مختلف شهرستان با استفاده از تله‌های زنده‌گیر صید گردیدند. این جوندگان در فیلد با استفاده از کلروفرم بیهوش و از لاله گوش هر حیوان چهار عدد لام بروش سمباده زنی تهیه و سپس مشخصات مرفومتریک آنها بطور کامل اندازه‌گیری و ثبت گردید. شکم هر جونده با تیغ جراحی باز و کبد و طحال هر نمونه در تیوبهای شماره‌گذاری شده حاوی اتانول ۷۰ درصد نگهداری و بقیه بدن نیز پس از پاکسازی در بطریهای حاوی فرمالین ده درصد جهت تاکسیدرمی و تعیین هویت به آزمایشگاه جانورشناسی ارسال گردید. لامهای تهیه شده هم به روش میکروسکپیک (رنگ آمیزی با گیمسا) و هم مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. کبد و طحال هر نمونه مورد استخراج DNA و تکثیر آن قرار گرفتند. استخراج DNA بروش Proteinase K و فنل/کلروفرم/آیزوآمیل الکل انجام و تکثیر آنهم به روش Nested-PCR و با استفاده از پرایمرهای LIN R4-Lin17-LIN19 که بطور اختصاصی بخش متغیر (Variable) مینی سیرکلهای کینتوپلاست گونه‌های مختلف انگلهای لیشمانیا را تکثیر می‌نمایند، انجام پذیرفت. این پرایمرها قادر به تشخیص و تمایز میان گونه‌های لیشمانیای موجود در کشور بودند.

یافته‌ها: در مجموع ۱۰۶ سر جونده صید گردید که از پنج گونه از سه جنس مختلف بودند. گونه *Meriones persicus* با ۲۷/۳۵ درصد صید گونه غالب بود. آلودگی لیشمانیایی بطریقه میکروسکپی در یک نمونه ماده گونه *Tatera indica* (۳/۷٪)، یک نمونه ماده گونه *Meriones hurrianae* (۳/۸۵٪) و یک نمونه نر گونه *Gerbillus nanus* (۵/۸۸٪) مشاهده گردید. در روش مولکولی نیز یک مورد آلودگی در گونه *T. indica*، دو مورد آلودگی در دو نمونه ماده M. *hurrianae* (۷/۶۹٪) و دو مورد آلودگی در نمونه‌های نر وماده‌ای از G. nanus (۱۱/۷۶٪) مشاهده و گونه انگل L. major شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: جوندگان دم جارویی به وفور و با تنوع نسبتاً زیاد در شهرستان جاسک و درمجاورت اماکن انسانی فعالیت می‌نمایند. گونه‌های *T. indica*، *M. hurrianae* و *G. nanus* بعنوان میزبانان مخزن بیماری در این کانون معرفی می‌شوند. این مطالعه اولین مطالعه مولکولی مخازن بیماری لیشمانیوز در جنوب شرقی کشور می‌باشد. آلودگی گونه *ژربیلوس نانوس* به *لیشمانیا ماژور* برای اولین بار در دنیا گزارش می‌گردد.

کلید واژه‌ها: لیشمانیوز پوستی، جوندگان دم جارویی، Nested-PCR، لیشمانیا ماژور، تاترا ایندیکا، ژربیلوس نانوس، مریونس هوریانه، جاسک، ایران.

وصول مقاله: ۸۹/۱۰/۴ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۱۲/۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۱۷

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

مقدمه

جوندگان (Order Rodentia) بزرگترین راسته پستانداران هستند که با جمعیتی بیش از کل جمعیت سایر پستانداران بر روی کره زمین منشأ خسارات اقتصادی و بهداشتی فراوانی می‌باشند (۱). یکی از مهمترین معضلات بهداشتی این جانوران نقش آنها بعنوان میزبان مخزن بیماریهای زئونوز می‌باشد و یکی از مهمترین این بیماریها بیماری لیشمانیوز جلدی یا سالک است (۲). لیشمانیوز به مجموعه بیماریهایی اطلاق می‌شود که بوسیله گونه‌های پاتوژن انسانی از جنس Leishmania spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) ایجاد شده و با بروز سالیانه دو میلیون نفر در دنیا از نظر سازمان جهانی بهداشت (WHO) جزء هشت بیماری مهم مناطق گرمسیری است (۳). تاکنون ۲۱ گونه از این انگل بعنوان پاتوژن انسانی شناخته شده‌اند (۴). از بین چهار فرم اصلی لیشمانیوز دو نوع لیشمانیوز پوستی یا سالک و لیشمانیوز احشایی یا کالا آزار در ایران وجود دارد (۵). لیشمانیوز پوستی خود به دو فرم شهری یا خشک با عامل اتیولوژیک *Leishmania tropica* و مرطوب یا روستایی با عامل *Le. major* دیده می‌شود (۶). بطور کلی بیماری سالک در چند دهه اخیر همواره در کشور در حال گسترش حوزه جغرافیایی خود بوده و در حال حاضر این بیماری در ۱۵ استان کشور بصورت اندمیک وجود داشته و در سایر مناطق نیز بصورت اسپورادیک وجود دارد. تعداد موارد سالیانه ثبت شده بیماری در ایران ۳۰-۲۰ هزار نفر بوده و بروز سالیانه آن حدود ۲۸ در هر یکصد هزار نفر جمعیت در معرض خطر است (۷).

لیشمانیوز جلدی مرطوب در مناطق خشک و نیمه خشک شمال آفریقا، خاورمیانه و آسیای مرکزی شیوع دارد. جاییکه پشه خاکی *Phlebotomus papatasi* ناقل اصلی و قطعی آن بوده و گونه‌های مختلف جوندگان دم جارویی زیر خانواده Gerbillinae (Rodentia: Muridae) بعنوان میزبانان مخزن (Reservoir Hosts) عمل می‌نمایند (۸). در آسیای مرکزی ژربیل بزرگ (*Rhombomys opimus*) و در شمال آفریقا و خاورمیانه *Psammomys obesus* میزبانان مخزن اصلی انگل هستند (۲). در ایران نیز تاکنون گونه‌های متعددی از این جانوران بعنوان مخازن بیماری گزارش گردیده‌اند. میزبان مخزن اصلی در ایران گونه *R. opimus* می‌باشد که در نواحی مرکزی، شمال و شمالشرق کشور و نیز در جنوب تهران آلوده پیدا شده است (۱۱-۹ و۵). جرد لیبی *Meriones libycus* مخزن مهم بعدی است که تقریباً در تمام مناطقی که *رومبومیس اوپیموس* مخزن اصلی است، نقش مخزن ثانویه را داشته (۱۲) و علاوه بر آن در کانونهایی مثل ارسنجان، نیریز و مرودشت استان فارس (۱۵-۱۳) و نیز دامغان و اردستان بعنوان میزبان اصلی معرفی شده است (۱۷و۱۶). در مناطق غرب و جنوب غربی کشور گونه ژربیل هندی *Tatera indica* مخزن اولیه و گونه‌های *Nesokia indica* و *M. libycus* مخازن ثانویه هستند (۱۸). گونه *T. indica* در خرامه فارس نیز بعنوان میزبان اصلی گزارش شده است (۱۹). در جنوب شرقی کشور گونه جرد بیابانی هندی یا *Meriones hurrianae* مخزن اصلی و *T. indica* مخزن ثانویه است (۲۰). اخیراً در شهرستان لارستان فارس *T. indica* و نیز دو گونه جونده از جنس Gerbillus s.l. بعنوان میزبانان مخزن بیماری گزارش شده ولی این جوندگان در حد گونه شناسایی نشده اند (۲۱). علاوه بر این گونه انگل، اخیراً انگل *Leishmania turanica* نیز از جونده *Nesokia indica* در استان کرمانشاه شناسایی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

شده است. هر چند این گونه پاتوژن انسانی نیست ولی همزمانی آن با *Le. major* ممکن است در بیماریزایی این گونه تأثیر مثبت بگذارد (۲۲).

در تمام این مناطق پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل اصلی و قطعی بیماری به انسان بوده است (۲۵-۲۳ و۱۱و۵). البته بجز این گونه، پشه خاکیهای دیگری نیز بعنوان ناقل انگل در بین جوندگان در مناطق روستایی کشور گزارش شده‌اند از جمله *P.(Paraphlebotomus) alexandri*، *P. (Para) andrejevi*، *P. (Para) caucasicus*، *P. (Para) moghulensis* و *P. (Synphlebotomus) ansarii* و *P.(P.) salehi* (۲۶ و۲۳ و۵).

روشهای مولکولی مبتنی بر PCR سالهاست که با سهولت و بطور روتین در آزمایشگاههای معتبر دنیا و نیز بوسیله محققین داخلی برای شناسایی انگل در بدن ناقلین و مخازن بیماری لیشمانیوز با موفقیت استفاده می‌شوند (۲۸و۲۷و۲۵و۱۵و۱۴). این روشها با حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به تشخیص تعداد کم انگل بوده و از منابع مختلف DNA مثل هسته، کینتوپلاست، ریبوزوم و غیره استفاده می‌نمایند (۲۹ و۲۷).

شهرستان جاسک در شرق استان هرمزگان و در مجاورت استان سیستان و بلوچستان در چند سال اخیر شاهد افزایش تدریجی تعداد موارد بیماری بوده بطوریکه تعداد موارد در سال ۱۳۸۵، ۲۲۳ مورد و در سال ۱۳۸۶ به ۲۴۵ مورد رسید (آمار مرکز بهداشت استان هرمزگان، منتشر نشده). از آنجا که با توجه به وضعیت توپوگرافیک استان و پراکندگی پیوسته مخازن بیماری در دشتهای ساحلی استان احتمال گسترش بیماری به سایر مناطق استان به شدت مطرح بوده و طرحریزی یک استراتژی کنترلی بدون اطلاع از گونه‌های جوندگان مخزن بیماری میسر نیست، مطالعه حاضر بمنظور شناسایی فون جوندگان این شهرستان و تعیین میزبانان مخزن بیماری سالک اجرا گردید.

روش بررسی

مطالعه حاضر مطالعه‌ای توصیفی (Descriptive) بود که در شهرستان جاسک واقع در منتهی الیه شرقی استان هرمزگان انجام شد. این شهرستان با مختصات جغرافیایی (′۵۸،°۲۶ - ′۲۴،°۲۵ عرض شمالی و ′۱۱،°۵۷ - ′۱۵،°۵۹ طول شرقی از نصف النهار گرینویچ) در ساحل شمالی دریای عمان قرار داشته و دارای آب و هوایی گرم و مرطوب است.

صید جوندگان در فصول بهار، پاییز و زمستان سال ۱۳۸۶ در روستاهای انتخابی شهرستان که از مناطق مختلف اقلیمی شهرستان انتخاب شده بودند انجام گردید. به این صورت که ماهیانه یکبار و هر بار ۱۰ تله زنده‌گیر Sherman در هنگام غروب آفتاب در اطراف لانه‌های فعال نصب و صبح روز بعد جمع‌آوری می‌گردیدند. از خرما، خیار سبز و گردو بعنوان طعمه استفاده می‌گردید. پس از جمع‌آوری، تله‌های حاوی جونده درون یک کیسه نایلونی قرار داده شده و با پنبه آغشته به کلروفرم بیهوش می‌شدند. سپس کلیه مشخصات مرفومتریک جونده اندازه‌گیری و ثبت و شماره‌گذاری شده و به روش سمباده زنی از سروزیته هر گوش آن دو عدد لام تهیه می گردید (۳۰). پس از اطمینان از مرگ حیوان با استفاده از تیغ جراحی استریل، شکم جونده باز و کبد و طحال آن در ظرف در پیچدار شماره‌گذاری شده حاوی اتانول ۷۰٪ قرار داده شده و خود جونده نیز پس از پاکسازی شکم در ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ جهت تاکسیدرمی و تعیین هویت به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه شیراز ارسال می‌گردید. تشخیص جوندگان در آزمایشگاه جانورشناسی موزه تاریخ طبیعی دانشگاه شیراز و با کمک کلید تشخیصی جوندگان ایران (۱) انجام و نمونه‌های مشکوک جهت تأیید به مرکز تحقیقات جونده شناسی دانشگاه مشهد ارسال می‌شد.

لامهای تهیه شده از گوش و قاعده دم موشها به روش میکروسکپیک و رنگ آمیزی گیمسا مورد بررسی بمنظور مشاهده آماستیگوتهای انگل قرار گرفتند. در صورت مشاهده جسم لیشمن، لامهای مثبت وارد پروسه استخراج DNA می‌شدند. استخراج DNA از لامهای حاوی اجسام لیشمن بروش معتضدیان و همکاران انجام شد (۳۱). به اینصورت که سطح لامها با تیغ بیستوری استریل تراشیده و مواد حاصله به یک میکروتیوب اپندورف انتقال داده شده و با اضافه نمودن Lysis Buffer و Proteinase K و متعاقباً محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل از آنها استخراج DNA صورت می‌گرفت. همچنین گاهی بدون تراشیدن سطح لام که معمولاً باعث از دست رفتن مقدار زیادی از مواد روی لام می‌شد، مستقیماً مقداری Lysis Buffer به محتویات روی لام اضافه شده و پس از چند دقیقه نگهداری در حرارت اطاق با استفاده از سمپلر محتویات روی لام به یک لوله اپندورف انتقال داده می‌شد. این عمل برای چند بار تکرار می‌شد تا محتویات روی لام بخوبی شسته شود. بقیه مراحل مثل قبل بود.

استخراج DNA از کبد و طحال نیز به روش عزیزی و همکاران انجام شد (۳۲ و۲۸ و۲۵). به این ترتیب که تکه‌های کوچکی از این اندامها بریده شده و در لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری له و هموژنایز می‌شد. سپس ۲۰۰µl Lysis Buffer و ۱۲ µl پروتئیناز K اضافه و بصورت Overnight در انکوباتور ۳۷°C قرار داده می‌شد. سپس ۳۰۰µl محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل اضافه و ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شد. پس از جداسازی فاز حاوی DNA، به نسبت ۱:۱۰ استات سدیم و دو تا سه برابر حجم محلول حاوی DNA، اتانول ۱۰۰ درصد سرد اضافه و مجدداً بمدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با خارج نمودن الکل، DNA رسوب داده شده پس از خشک نمودن و اضافه نمودن میزان لازم بافر TE تا زمان PCR در یخچال ۴°C نگهداری می‌گردید.

برای تکثیر ناحیه متغیر (Variable) مینی سیرکلهای DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا (minicircle kDNA) از تکنیک Nested-PCR استفاده گردید. در این تکنیک از پرایمرهای LINR4 بعنوان فورووارد در هر دو مرحله، پرایمر LIN17 بعنوان Reverse مرحله اول و پرایمر LIN19 بعنوان پرایمر Reverse مرحله دوم استفاده گردید. توالی پرایمرها بصورت زیر بود.

-LIN R4: 5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3'.
-LIN 17: 5'- TTT GAA CGG GAT TTC TG-3'.
-LIN 19: 5'- CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'.

این تکنیک توسط Aransay و همکاران در سال ۲۰۰۰ طراحی شده و بوسیله نگارنده در مطالعات متعددی برای تشخیص انگل لیشمانیا در بدن ناقلین و مخازن لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته بود (۲۸ و۲۶). حجم مواد مورد نیاز و پروفایل حرارتی دو مرحله بصورت زیر بود.

250 µM of each dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 1U *Taq* Polymerase (Cinagene, Tehran), 1 µM primer LINR4, 1 µM primer LIN 17, 5 µl of DNA extract in 1X PCR buffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

این حجم مواد در هر دو مرحله یکسان بود فقط پرایمر Reverse در مرحله دوم تعویض شده و دو مایکرولیتر از محصول مرحله اول بعنوان Template DNA برای واکنش مرحله دوم استفاده می‌شد. در مرحله اول پس از یک حرارت اولیه 94C° بمدت ۵ دقیقه(Initial Denaturation)، تکثیر ادامه می‌یافت با ۳۰ ثانیه در 94C° (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در 52C° (Annealing) و ۱ دقیقه در72C° (Extension) و نهایتاً ۱۰ دقیقه حرارت 72C° (Final Extension) (مرحله اول در ۳۰ سیکل تکرار می‌شد). پروفایل حرارتی مرحله دوم نیز شبیه مرحله اول بود البته بدون حرارت اولیه و نیز درجه حرارت مرحله Annealing آن 58C° بود. مرحله دوم ۳۳ سیکل تکرار می‌شد.

پس از تکثیر DNA مورد نظر، میزان ۵ مایکرولیتر از محصول PCR پس از اختلاط با Loading Buffer بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بمدت حدود ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و پس از آشکارسازی در دستگاه UV Transilluminator با مقایسه باندهای حاصله از نمونه‌های مورد بررسی با باندهای حاصل از استرینهای استاندارد مورد شناسایی قرار می‌گرفتند. از استرینهای استاندارد :*Le. infantum* MCAN/IR/96/Lon49، *Le. tropica*: MHOM/IR/89/ARD2 و *Le. major*: MHOM/IR/54/LV39 جهت مقایسه استفاده گردید. این استرینها از گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی شیراز گرفته شده بود. برای کلیه واکنشها بمنظور اطمینان از صحت عملکرد از کنترل منفی که DNA استخراج شده از کبد جوندگان سالم بود استفاده می‌گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۱۰۶ جونده صید گردید که از پنج‌گونه مختلف بودند. گونه *Meriones persicus* با ۲۹ درصد صید گونه غالب بود. در این مطالعه صید جوندگان صرفاً از خارج از اماکن و حاشیه روستاها انجام شد و در نتیجه هیچگونه موش خانگی (*Mus musculus*) که معمولاً در مطالعات تعیین فون جوندگان صید می‌شود، صید نگردید. گونه‌ها، تعداد و درصد صید جوندگان در مناطق تحت بررسی شهرستان جاسک در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: تعداد و درصد صید جوندگان در روستاهای مورد مطالعه شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۸۷-۱۳۸۶

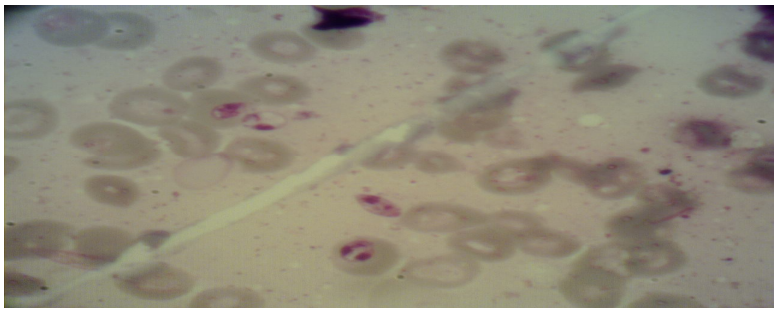
گونه	شرق شهرستان (دشت)			مرکز شهرستان (کوهستانی)	غرب شهرستان (دشت)			کل صید گونه			درصد صید گونه به کل
	گوهرت	سورک	لیردف	گوا	گنگان	نگر	جاسک کهنه	♂	♀	کل	
Meriones persicus	۰	۰	۱	۰	۹	۸	۱۱	۱۲	۱۷	۲۹	۲۷/۳۵
Tatera indica	۰	۰	۰	۲	۵	۸	۱۲	۱۳	۱۴	۲۷	۲۵/۴۷
Meriones hurrianae	۴	۹	۱۱	۰	۲	۰	۰	۱۴	۱۲	۲۶	۲۴/۵۲
Meriones lybicus	۰	۰	۰	۰	۱	۶	۰	۵	۲	۷	۶/۶۰
Gerbillus nanus	۳	۶	۸	۰	۰	۰	۰	۱۰	۷	۱۷	۱۶/۰۳
کل صید	۷	۱۵	۲۰	۲	۱۷	۲۲	۲۳	۵۴	۵۲	۱۰۶	۱۰۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

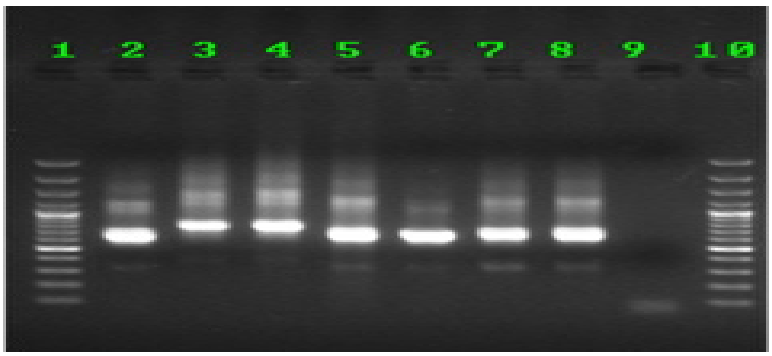
کلیه جوندگان صید شده مورد نمونه برداری بمنظور تشخیص آلودگی لیشمانیایی بروش میکروسکپیک و نیز مورد بررسی به منظور تشخیص DNA انگل لیشمانیا در کبد و طحالشان قرار گرفتند که نتایج مربوطه در جدول ۲ به تفکیک مشخص شده است. آلودگی تأیید شده در کلیه نمونه‌های مربوط به گونه های *تاترا ایندیکا* و *مریونس هوریانه* از جنس ماده بود ولی در گونه *ژربیلوس نانوس* در روش مولکولی یک مورد آلودگی در جنس نر و یک مورد هم در جنس ماده ملاحظه گردید (تصاویر ۱ و ۲).

جدول ۲: نتایج مربوط به شناسایی مخازن بیماری سالک، شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۸۷-۱۳۸۶

گونه	تعداد صید	درصد صید به کل	تعداد آلوده		درصد آلودگی در گونه	
			میکروسکپی	PCR	میکروسکپی	PCR
Meriones persicus	۲۹	۲۷/۳۵	۰	۰	۰	۰
Tatera indica	۲۷	۲۵/۴۷	۱ (♀)	۱ (♀)	۳/۷۰	۳/۷۰
Meriones hurrianae	۲۶	۲۴/۵۲	۱ (♀)	۲ (♀)	۳/۸۵	۷/۶۹
Gerbillus nanus	۱۷	۱۶/۰۳	۱ (♂)	۲ (♀,♂)	۵/۸۸	۱۱/۷۶
Merones lybicus	۷	۶/۶۰	۰	۰	۰	۰
کل صید	۱۰۶	۱۰۰	۳	۵	۲/۸۳	۴/۷۱



تصویر ۱: آماستیگوت لیشمانیا ماژور در نمونه تهیه شده از جونده Meriones hurriane ، شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷



تصویر۲: نتیجه الکتروفورز محصولات Nested-PCR نمونه‌های جوندگان شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷ با پرایمرهای LINR4، LIN17 و LIN19 در ژل آگاروز ۱/۵٪. سایز مارکر (ستونهای ۱ و 10)، استرین استاندارد لیشمانیا ماژور (۲)، استرین استاندارد لیشمانیا تروپیکا (۳)، استرین استاندارد لیشمانیا اینفانتوم (۴)، دو نمونه ژربیلوس نانوس (ستونهای ۵ و ۶)، یک نمونه مریونس هوریانه (ستون ۷)، یک نمونه تاترا ایندیکا (ستون ۸)، و کنترل منفی (ستون ۹).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

بحث و نتیجه‌گیری

شهرستان جاسک در جنوب شرقی کشور در سالهای اخیر شاهد افزایش ناگهانی بروز بیماری بوده و در تقسیم بندی اپیدمیولوژیک بیماری همراه با شهرستان بستک جزء استراتوم یک (API>1) قرار گرفته بود. با توجه به شرایط اقلیمی مناسب استان هرمزگان بخصوص پیوستگی دشتهای ساحلی حاشیه شمالی خلیج فارس و دریای عمان و عادت مهاجرت جوندگان ژربیلینه و احتمال گسترش بیماری بطرف غرب و شهرستان بندرعباس مطالعه حاضر بمنظور شناسایی مخازن بیماری در این کانون اجرا گردید.

در این مطالعه پنج گونه جونده ژربیلینه بعنوان فون جوندگان دم جارویی شهرستان جاسک تعیین هویت گردیدند. از بین نمونه‌های صید شده گونه‌های *Meriones persicus* با ۲۷/۳۵ درصد، *Tatera indica* با ۲۵/۴۷ درصد، *Meriones hurrianae* با ۲۴/۵۲ درصد، *Gerbillus nanus* با ۱۶/۰۳ درصد و *Meriones lybicus* با ۶/۶ درصد صید به ترتیب فراوانترین گونه‌های صید شده بودند. از آنجا که نمونه‌گیری در حاشیه روستاها انجام شد، موش خانگی *Mus musculus* که در اکثر مطالعات تعیین فون جوندگان گزارش می‌گردد، صید نشد.

تاکنون مطالعات محدودی در ارتباط با فون جوندگان دم جارویی در استان هرمزگان انجام شده است. در مطالعه سلیمانی احمدی و همکاران، در منطقه کهورستان شهرستان بندرعباس فقط گونه *Rhombomys opimus* صید گردید (۳۳). نکته قابل توجه این است که در مطالعه حاضر گونه *R. opimus* که مخزن اصلی بیماری در اکثر مناطق مرکزی و شمال شرقی کشور است، صید نگردید. اگر چه قطعاً فون جانوری در شرایط جغرافیایی مختلف ممکن است متفاوت باشد، ولی شباهت زیاد شرایط اقلیمی مناطق جاسک و کهورستان لزوم بازبینی و تکرار مطالعه در منطقه کهورستان را ضروری می‌سازد. حنفی بجد و همکاران در شهرستان حاجی آباد دو گونه *Meriones persicus* و *Tatera indica* را گزارش نمودند که دو گونه غالب صید شده در مطالعه حاضر هم بوده‌اند ولی در هیچیک از نمونه‌های صید شده این محققین آلودگی لیشمانیایی دیده نشد (۳۴).

در این مطالعه در سه جونده *Tatera indica*، *Meriones hurrianae* و *Gerbillus nanus* آلودگی لیشمانیایی با هر دو روش میکروسکپیک و مولکولی مشاهده گردید. در گونه *T. indica* در هر دو روش تشخیصی فقط یک مورد آلودگی به *لیشمانیا ماژور* مشاهده شد. در گونه *M. hurrianae* یک مورد آلودگی به روش میکروسکپیک در یک نمونه ماده و دو مورد آلودگی در دو نمونه ماده بروش PCR اختصاصی اثبات گردید. در گونه *G. nanus* نیز در روش میکروسکپیک یک مورد آلودگی لیشمانیایی در یک نمونه نر و در روش مولکولی علاوه بر آن نمونه، یک مورد آلودگی نیز در یک نمونه ماده مشاهده و ثبت گردید. شایان ذکر است که روش میکروسکپیک صرفاً با بررسی لامهای تهیه شده از گوش جوندگان انجام ولی روش مولکولی هم بر روی لامهای پوستی مثبت و هم نمونه‌های کبد و طحال انجام گردید. لذا روش مولکولی قادر بود دو نمونه‌ای که لامهای تهیه شده از گوششان بروش میکروسکپیک منفی اعلام شده بود را مثبت تشخیص دهد که این مسأله حساسیت بیشتر روش مولکولی را در تشخیص انگل نشان می‌دهد.

آلودگی ژربیل هندی (*T. indica*) به *لیشمانیا ماژور* در مطالعات متعددی بخصوص در مناطق غربی و جنوب

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

غربی کشور گزارش شده است. جوادیان و همکاران این گونه را بعنوان میزبان مخزن اصلی سالک نوع مرطوب در استانهای ایلام و خوزستان گزارش نموده‌اند (۱۸). در این مناطق گونه‌های *Nesokia indica* و *Meriones lybicus* بعنوان مخازن ثانویه بیماری مطرح هستند. عسکری و همکاران اینگونه را بعنوان مخزن *ل. ماژور* در منطقه خرامه شیراز گزارش نمودند (۱۹). مهربانی و همکاران نیز در شهرستان لارستان استان فارس که در همسایگی استان هرمزگان قرار گرفته است، با روشهای میکروسکوپیک و مولکولی آلودگی همین گونه را گزارش نمودند (۲۱).

گونه جرد هندی صحرایی، *Meriones hurrianae* مخزن اصلی سالک روستایی در جنوب شرقی کشور محسوب می‌گردد، جاییکه معمولاً *تاترا ایندیکا* بعنوان مخزن ثانویه عمل می‌نماید (۲۰). محبعلی و همکاران آلودگی این گونه به *ل. ماژور* را به روشهای میکروسکوپی، ایزوآنزیمی و RAPD-PCR در جنوب شرقی کشور شامل جنوب بلوچستان و مناطق دشتیاری، کنارک و چابهار گزارش نمودند (۳۵). آلودگی این گونه در کشور ایران محدود به جنوب شرقی کشور بوده است و در مطالعه حاضر نیز آلودگی در مناطق همجوار استان سیستان و بلوچستان گزارش می‌گردد. گونه *مریونس هوریانه* در استان راجستان هندوستان نیز به *لیشمانیا ماژور* آلوده گزارش شده است (۳۶).

بر اساس تحقیقات گسترده نویسندگان، آلودگی ژربیل بلوچستان *Gerbillus nanus* به انگل *لیشمانیا ماژور* تاکنون در هیچ منبع علمی ذکر نشده و بنظر می‌رسد آلودگی این گونه به انگل لیشمانیا در این تحقیق برای اولین بار در سطح دنیا می‌باشد. مهربانی و همکاران برای اولین بار بروش میکروسکپیک و مولکولی دو نمونه از جوندگان جنس .Gerbillus spp را آلوده به *لیشمانیا ماژور* در منطقه لارستان استان فارس گزارش نمودند. آنها گونه این جونده را ذکر ننمودند ولی بر اساس اندازه نمونه‌ها (دو مورد آلودگی) که بزرگ بوده‌اند، قطعاً این دو نمونه از گونه نانوس نبوده‌اند (۲۱). البته در کشورهای حوزه خاورمیانه از جمله مصر، اردن و فلسطین اشغالی مواردی از آلودگی گونه‌هایی از جنس ژربیلوس از جمله *Gerbillus pyramidum* و *Gerbillus dasyurus* به *ل. ماژور* گزارش شده است ولی هیچیک از این گزارشات در مورد گونه نانوس نبوده است (۳۸ و۳۷).

در این مطالعه آلودگی سه گونه جونده ذکر شده فوق با هر دو روش میکروسکپیک و PCR اختصاصی مشاهده گردید. روش مولکولی در تشخیص آلودگی موفق‌تر عمل نمود بطوریکه روش میکروسکوپی ۳ مورد آلودگی و روش مولکولی ۵ مورد آلودگی را مشخص نمود. از آنجا که در روش PCR ، DNA انگل مورد جستجو قرار می‌گیرد و اختصاصیت و حساسیت آنهم بسیار بالاست، انتظار هم می‌رفت که قدرت تشخیصی آن نسبت به روش میکروسکپیک که بسیار وابسته به مهارت و قدرت تشخیص فرد میکروسکوپیست می‌باشد، بالاتر باشد. این مسأله در مطالعات سایر محققین نیز مورد تأکید قرار گرفته است (۲۹ و۱۹).

مطالعه حاضر اولین مطالعه با استفاده از روش مولکولی PCR برای تعیین مخازن بیماری لیشمانیوز پوستی در استان هرمزگان بوده است و برای اولین بار در این منطقه از کشور انگل *لیشمانیا ماژور* از جوندگان ژربیلیده شناسایی شده است. آلودگی هر سه گونه جونده *G. nanus*، *T. indica* و *M.hurrianae* به لیشمانیا ماژور برای اولین بار در این استان گزارش می‌گردد. آلودگی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

گونه *ژربیلوس نانوس* به لیشمانیا ماژور برای اولین بار در سطح دنیا گزارش می‌شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این تحقیق، بیماری سالک در این کانون نوظهور، از نوع روستایی یا مرطوب با عامل *لیشمانیا ماژور* می‌باشد و سه گونه جونده *تاترا ایندیکا*، *مریونس هوریانه* و *ژربیلوس نانوس* بعنوان میزبانان مخزن بیماری معرفی می‌گردند که بنظر می‌رسد هر سه گونه بعنوان میزبانان مخزن فعال بیماری در منطقه عمل می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان و با شماره ۲۵۱/پ/م مورخ ۱۳۸۷/۱۰/۱۱ بوده و با حمایت مالی آن انجام شده است. نویسندگان از همکاریهای صمیمانه مسؤولین مرکز بهداشت استان هرمزگان و شهرستان جاسک و بهورزان منطقه بخصوص آقای عبدالله زرین زاده کمال تشکر را دارند. همچنین از آقای غلام محسنی تکنسین آزمایشگاه مالاریای مرکز بهداشت استان هرمزگان بخاطر همکاری در نمونه‌گیریهای میکروسکپیک از جوندگان، سرکار خانم ادنافی مسؤول موزه تاریخ طبیعی دانشگاه شیراز بخاطر شناسایی جوندگان و جناب آقای دکتر درویش مسؤول مرکز تحقیقات جونده شناسی دانشگاه مشهد بخاطر تأیید نمونه‌ها صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند. مطالعات مولکولی این تحقیق در گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی شیراز انجام شده است.

References

1. Etemad A. Mammals of Iran. 1st ed. National Association of Natural Resources Protection Press, Tehran. 1978. p. 133-156 [in Persian].
2. Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30: 1269-81.
3. WHO: Report of the scientific working group on Leishmaniasis. Geneva; Meeting Report, 2-4 Feb. 2004. Available from http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/swg-report-leishmaniasis.
4. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123: 311-330.
5. Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. I. The human disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 61: 534-542.
6. Killick-Kendrick R. The life cycle of Leishmaniasis in the sand fly with special reference to the form infective to vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp 1990; 65: 37-42.
7. Mohebali M. Zoonotic protozoa diseases. 1st ed, Tehran: Nadi Press. 1996. p. 74-74 [in Persian].
8. Ashford RW, Bettini S. Leishmaniasis. Ecology & Epidemiology: Old World. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R (Eds). The leishmaniases in biology & medicine. London: Academic press. 1987. p. 366-424.
9. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. Khorassan area, Part I: the reservoirs. Bul Soci Pathol Exotique 1967; 60: 510-518.
10. Seyedi-Rashti MA, Salehzadeh A. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis near Tehran, Iran. Bul Soci Franca Parasitol 1990; 8, Supplement 2: 1145 (Abstract).
11. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshagh MA, Rafizadeh S, Mohebali M and et al. Molecular detection of Leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan Province, Iran. Iran J Arth-Borne Dis 2008; 2: 21-27.
12. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebali M. Meriones libycus and Rhombomys opimus (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 503-504.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

13. Rassi Y, Jalali M, Javadian E, Moatezedian MH. Confirmation of Meriones libycus (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Arsanjan, Fars province, south of Iran (1999-2000). Iran J Publ Health 2001; 30: 143-144.
14. Rassi Y, Qasemi M, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Aghayee-Afshar A and et al. Determination of reservoir(s) and vector(s) of cutaneous leishmaniasis by Nested-PCR in Marvdasht district, Fars province, southern Iran. Kerman Journal of Medical Sciences 2007; 14: 134-139.
15. Momenbellah-fard, Kalantari M, Rassi Y, Javadian E. The PCR-based detection of Leishmania major infections in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2003; 97: 811-816.
16. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Kalantari M. Rodent infection with Leishmania in a new focus of human cutaneous leishmaniasis, in northern Iran. Annals of Tropical Medicine & Parasitology 2008; 102: 127-133.
17. Yaghoobi Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahrai-Ramazani AR, Mohebali M. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major in Ardestan town, central Iran. Acta. Trop 2001; 79: 115-121.
18. Javadian E, Dehestani M, Nadim M, Rassi Y, Tahvildari-Bidruni C, Seyedi-rashtyi MA, and et al. Confirmation of Tatera indica (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the west of Iran. Iranian J Publ Health 1998; 27: 55-60.
19. Asgari Q, Motazedian MH, Mehrabani D, Oryan A, Hatam GR, Owji SM, and et al. Zoonotic Leishmaniasis in Shiraz, southern Iran: A molecular, isoenzyme and morphologic approach. Journal of Research in Medical Sciences 2006; 12: 7-15.
20. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. Cutaneous leishmaniosis in Baluchistan Iran. Abstract and Poster, Volume XI, International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Calgari, Canada, 16-22 September, P: 124.1984.
21. Mehrabani D, Motazedian MH, Oryan A, Asgari Q, Hatam GR, Karamian M. A search for the hosts of Leishmania major in the Larestan region of southern Iran: demonstration of the parasite in Tatera indica and Gerbillus sp., by microscopy, culture and PCR. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101: 315-322.
22. Hajjaran H, Mohebali M, Alimoradi S, Abaei MR, Edrissian GH. Isolation and characterization of pathogenic Leishmania turanica from Nesokia indica (Rodentia: Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2009; 103: 1177-1179.
23. Javadian E, Nadim A, Tahvildari-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran, B. Khorasan, Part v, Report on focus of zoonotic leishmaniasis in Esfarayen. Bull Soc Path Exot 1976; 69: 140-143.
24. Yaghoobi-ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Jalali-Zand AR, Piazak N. Bionomics of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. J Vector Ecol 2004; 30: 115-118.
25. Yaghoobi-ershadi MR, Javadian E, Tahvildari-Bidruni GH. The isolation of Leishmania major from Phlebotomus (Paraphlebotomus) caucasicus, in Isfahan province, Islamic Republic of Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 518-519.
26. Azizi K, Rassi Y, Momenbellah-Fard MD. PCR-based detection of Leishmnia major kDNA within naturally infected Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae); the vector of cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2010; 104 : 440-442.
27. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 1933-1938.
28. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershdi MR. First detection of leishmania infantum in Phlebotomus (Larroussius) major from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Fars province, south of Iran. J Med Entomol 2008; 45: 726-731.
29. 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 : S243-250.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]

30. Edrissian GH, Zovein Z, Nadim A. A simple technique for preparation of smears from the ear of Rhombomys opimus for the detection of Leishmania infection. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1982; 76: 706-707.
31. Motazedian M H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96: 31-34.
32. Rassi Y, Azizi K, Motazedian MH, Rafizadeh S, Fakhar M & Hatam GR. The seminested PCR based detection of Leishmania infantum infection in asymptomatic dogs in a new endemic focus of visceral leishmaniasis in Iran. Iranian J Arthropod-Borne Dis 2007; 1: 38-42.
33. Soleimani-Ahmadi M, Javadian E, Reisi A, Yaghoobi-Ershadi MR. Study on entomology fauna of psychodidae in Kahurestan area, Bandar Abbas. Hormozgan Medical Siences Journal 1998; 2: 25-30.
34. Hanafi-Bojd AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Zamani Q, Barzehkar A, Jaafari R, Pourabazari GR. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in Hajiabad county, Hormozgan province 2003. Hormozgan Medical Siences Journal 2006; 10: 63-70.
35. Mohebali M, Javadian E, 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- 598.
36. Morsy TA, Shoukry A, Schnur LF, Sulitzeanu A. Gerbillus pyramidum is a host of Leishmnaia major in the Sinai peninsula. Ann Trop Med Parasitol 1987; 81: 741-742.
37. Peters W. The identity of some stocks of Leishmnaia isolated in India. Ann Trop Med Hyg 1981; 75: 247-249.
38. Wesserberg G, Abramsky Z, Anders G, El Fari M, Schoenian G, Schnur L, and et al. The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host and epidemiological implications. Int J Parasitol 2002; 32: 133-143.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-11-22]