

## مقایسه روشهای مولکولی با دیگر روشهای متداول آزمایشگاهی در ردیابی انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی بیماری لیشمانیوز جلدی روستائی

پرویز پرویزی\*<sup>۱</sup>، قاسم مرادی<sup>۱،۲</sup>، عارف امیرخانی<sup>۳</sup>

۱. Ph.D. بیولوژی مولکولی با گرایش حشره شناسی پزشکی مولکولی، استادبارانستیتو پاستور ایران  
۲. فوق لیسانس (MSc) میکروبیولوژی  
۳. Ph.D. اپیدمیولوژی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشیار انستیتو پاستور ایران

\* نشانی برای مکاتبه: آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران- تهران، ۱۳۱۶۴ - ایران، تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۵ ،  
parp@pasteur.ac.ir  
دریافت مقاله: مرداد هشتاد و هفت. پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هفت

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری لیشمانیوز نوع روستائی یکی از بیماریهای مهم گرمسیری و عفونی در ایران و در بسیاری از کشورهای دیگر جهان می باشد که پشه های خاکی ناقلین و جوندگان گروه جربیلیده مخازن بیماری می باشند. تشخیص دقیق و قطعی انگل لیشمانیا در مخازن بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است. گاهی در مخازن حیوانی در جوندگان هیچگونه علامت و نشانه ای از بیماری مشاهده نمی شود و تعداد انگل در جونده محدود و کم است. هدف از این تحقیق مقایسه روشهای مولکولی با روشهای متداول آزمایشگاهی و تعیین مزیت احتمالی روشهای مورد اشاره در تشخیص دقیق و قطعی انگل لیشمانیا در مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی در منطقه آندمیک بیماری در آقا علی عباس نطنز بود.

**روش کار:** دو روش استخراج DNA از گوش جوندگان با سه روش متداول آزمایشگاهی لام مستقیم، کشت و تزریق به حیوان آزمایشگاهی مقایسه گردید. با استفاده از روش (Nested PCR) یک قطعه از ژن ITS- rDNA، بطوریکه این قطعه شامل (ITS1) با (5.8s rRNA gene) بوده است، تکثیر یافت که توالی این قطعه برای گونه های لیشمانیا اختصاصی، قابل تفکیک و تشخیص با یکدیگر بوده است.

**یافته ها:** از سه روش متداول آزمایشگاهی مورد استفاده در ۶۹ سر جونده، فقط یک مورد مثبت با استفاده از روش تزریق به حیوان آزمایشگاهی مشاهده گردید و روشهای لام مستقیم و محیط کشت برای تمام نمونه ها منفی بود. هر دو روش استخراج DNA از گوش جوندگان خوب ولی روش ISH-Horovize برای همه ۶۹ سر جونده استخراج DNA مثبت بود. در نهایت این روش حساس برای استخراج DNA انتخاب گردید. با استفاده از Nested PCR و از ژن ITS-rDNA انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی بیماری لیشمانیوز جلدی روستائی ردیابی گردید که از ۶۹ سر جونده، ۱۰ جونده آلودگی لیشمانیائی داشتند. پس از تعیین توالی برای ۹ جونده، لیشمانیا میجر و یک جونده، لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شد.

**نتیجه گیری:** روش های متداول آزمایشگاهی و روشهای مولکولی در تشخیص و ردیابی انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی لیشمانیوز جلدی روستائی با جزئیات و مفصل در مقاله بحث و بررسی گردیده است. روش های تشخیصی مولکولی در مقایسه با روش های متداول آزمایشگاهی حساس تر و نیز اختصاصی تر هستند. همچنین روش های مولکولی از نظر تشخیص قطعی گونه های لیشمانیا در جوندگان به روش های متداول آزمایشگاهی ارجحیت دارند. آلودگی های لیشمانیائی در مخازن به علت وحشی بودن جوندگان و مشکلات خاص نمونه برداری در میدان و انتقال به آزمایشگاه و نیز کم بودن تعداد انگل لیشمانیا در مخازن می توانند از محدودیت های تشخیص انگل با روش های متداول آزمایشگاهی باشد. استفاده از این روشها در مخازن حیوانی صحرائی، بسیار مشکل و امکان یافتن انگل دشوار است.

**واژگان کلیدی:** لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا، جوندگان، مخازن حیوانی، مقایسه روشهای مولکولی با روشهای متداول  
آزمایشگاهی، روشهای تشخیصی، ITS-ribosomal DNA

## مقدمه

لیشمانیوز یکی از مهمترین بیماری های گرمسیری است که در انسان به اشکال جلدی (سالم)، احشایی (کالا آزار) و جلدی مخاطی ظاهر می شود که در ایران دو نوع جلدی و احشایی شایع و نوع جلدی مخاطی تاکنون از ایران گزارش نشده است (۱ و ۲). سالم به دو فرم روستایی (مرطوب) و شهری (خشک) دیده می شود که عامل آن ها بترتیب لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیک

می باشد. لیشمانیوز جلدی روستایی بعلت طبیعت زئونوز آن از اهمیت بیشتری برخوردار است. لیشمانیا در فرم روستایی بوسیله نیش پشه های خاکی (فلبوتوموس) از مخازن حیوانی آن (معمولا جوندگان تحت خانواده جریلیده) به انسان انتقال می یابد (۳-۵).

از آنجا که اولین گام در برنامه ریزی جهت کنترل و مبارزه با بیماری، تعیین مشخصات دقیق عامل بیماری است، آگاهی از جوندگان مخزن موجود در هر منطقه و میزان آلودگی آن ها، شناسایی گونه ها و سویه های لیشمانیا در مخزن و آگاهی از تغییرات ژنتیکی آن ها می تواند نقش اساسی در برنامه ریزی، کنترل و پیشگیری از بیماری داشته باشد. گر چه مطالعات زیادی در زمینه عامل بیماری در کشور صورت گرفته است اما آلودگی های لیشمانیائی تشخیص داده شده بیشتر از انسان های بیمار بوده است و موارد بسیار کمی از جوندگان جدا گردیده اند (۴ و ۶-۸). تشخیص سویه های لیشمانیا در بیماران، ناقلین و مخازن برای تعیین سیر انتقال بیماری، مبارزه با مخزن و ناقلین، ساخت واکسن و فراهم کردن پادتنی جهت تشخیص و درمان اهمیت زیادی دارد (۳).

مطالعه بر روی آلودگی لیشمانیائی بر روی جوندگان در ایران از سال ۱۹۵۳ در شمال شرقی ایران در منطقه ترکمن صحرا و لطف آباد شروع شد (۹و۶). به تدریج این مطالعات به مناطق دیگر ایران گسترش پیدا کرد. در این مطالعات فقط روی آلودگی های لپتومونادی کار می شد و انگل دقیقاً جدا و تایپ نمی گردید. در اکثر مطالعات محققین در ایران رومومیس اپیموس بعنوان مخزن اصلی بیماری در ایران گزارش گردیده است. در مطالعات محققان ایرانی در بعضی از مناطق ایران مریونس لیپیکوس بعنوان مخزن ثانویه معرفی شده است. این دو جونده حتی در بعضی از مناطق ایران بخصوص در مناطق جنوبی و مرکزی ایران که لیشمانیوز جلدی نوع روستائی شایع است بعنوان مخازن انگل لیشمانیا میجر معرفی گردیده است. البته در مناطق ترکمن صحرا، لطف آباد، سرخس که هم مرز با کشور ترکمنستان است، در اسفراین در استان خراسان، بکران در استان سمنان، ابرقو در استان یزد، نیریز و استهبان در استان فارس انگل لیشمانیا از این دو جونده جدا شده و عقیده دارند که می بایست لیشمانیا میجر باشد (۲، ۴، ۱۰). در ابردژ ورامین در استان تهران در مناطق دور با اماکن انسانی آلودگی طبیعی لیشمانیائی نامشخصی را در جونده رومومیس اپیموس یافته اند. در مناطق جنوب و جنوب غربی ایران که هم مرز با عراق است که از سومار تا خلیج فارس ادامه دارد و شامل همه استان خوزستان، قسمتی از استانهای ایلام، بوشهر و هرمزگان می شود تاترا اندیکا بعنوان مخزن بیماری لیشمانیوز نوع روستائی شناخته شده است. در مناطق جنوب شرقی ایران مخزن اصلی بیماری را مریونس هوریا می دانند که این مناطق شامل مناطق جنوبی استان بلوچستان، دشت یاری، کنارک و چابهار است. بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی در این مناطق شبیه بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی گزارش شده از مناطق راجستان هند است (۲). از اهداف این

مطالعه تعیین گونه جوندگان در مناطق اندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی شهرستان نطنز استان اصفهان، گونه جوندگان دارای آلودگی لپتومونادی و تعیین قطعی انگل لیشمانیا در جوندگان این منطقه بود. در نهایت روش مولکولی با دیگر روشهای متداول آزمایشگاهی در تشخیص انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی بیماری مقایسه گردید. روشهای مولکولی معرفی شده در این مقاله می تواند در مطالعات تعیین و تشخیص آلودگیهای لیشمانیائی در مخازن حیوانی بیماری مورد استفاده دیگر محققین قرار گیرد (۱۱).

## روش کار

صید جونده با استفاده از تله های زنده گیر سیمی و چوبی از خرداد ماه تا آبان ماه ۱۳۸۶ و هر ماه بمدت ۱۰ روز و در اردیبهشت ماه و شهریور ماه ۱۳۸۷ از ۴ منطقه اندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی روستائی شهرستان نطنز، استان اصفهان شامل عباس آباد، بادرود، آقاعلی عباس و چاه عربها انجام شد. از خیار و خرما بعنوان طعمه استفاده می شد. بعد از صید جونده و انتقال آنها به حیوانخانه، گوش جونده را سمباده کشیده و بوسیله اسکالپل از سرورزیده موجود در گوش جونده نمونه تهیه و در محیط کشت N.N.N که حاوی آنتی بیوتیکهای استرپتو مایسین و پنی سیلین همراه سرم فیزیولوژی است کشت داده می شد. از محیط کشت دو فازی RPMI+N.N.N که در این حالت فاز مایع همان RPMI است بجای سرم فیزیولوژی استفاده می گردید. همچنین از سرورزیده موجود در گوش جونده لام مستقیم تهیه و با استفاده از عدسی چشمی ۱۰۰ با روغن ایمرسیون و بدون استفاده از لامل درزیر میکروسکوپ اجسام آماستیگوت جستجوی می شد (۱۲). برای تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی، بعد از برداشت سرورزیده از گوش جونده در داخل شیشه ساعت که از قبل مقدار حدود ۱ تا ۲ ml سرم فیزیولوژی به آن اضافه شده بود سرورزیده با سرم فیزیولوژی مخلوط شده و بعد با سرنگ انسولین کشیده و مایع مورد نظر چند بار پر و خالی می شد تا سرورزیده موجود با سرم فیزیولوژی کاملاً مخلوط گردد. در ادامه، مخلوط مورد نظر به قاعده دم حیوان حساس آزمایشگاهی که موش BALB/C است تزریق می گردید برای استخراج DNA از دوروش ISH-Horovize و فنل کلرو فرم استفاده شد. در استخراج DNA به روش ISH-Horovize از گوش جونده به اندازه حدود ۱/۲ سانتی متر با برش آن، نمونه برداری می شد. قبل از شروع، بافت گوش را به تکه های خیلی ریزی برش داده و سپس گوش آنها را در داخل میکروتیوبهای ۱/۵ منتقل و در ازت مایع (۱۹۶- در چه سانتی گراد) بمدت ۳-۵ دقیقه منتقل و پس از آن در بن ماری ۶۵ درجه بمدت ۳-۵ دقیقه قرار داده و سه بار این عمل تکرار می شد (این کار موجب لیز شدن نمونه مورد نظر شده (freez-thaw) و باعث جدا شدن راحت سلولهای بافت از هم می شود که در نهایت این عمل کمک زیادی به استخراج DNA می کند). سپس استخراج و خالص سازی (DNA extraction) جوندگان با روش Ready و همکاران ادامه می یافت (۱۳). از مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول (GM) Grinding Mix، ابتدا مقدار کمی از آن را داخل میکروتیوب ریخته و با نوک سرسمپلر نمونه ها کاملاً له می شد (نیاستی هیچ تکه درشتی باقی مانده باشد). سپس مابقی محلول GM (از مجموع ۱۰۰ میکرولیتر) را در میکروتیوب ریخته بعد مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول SDS mix به هر میکروتیوب اضافه می شد.

اشباع اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه به آرامی با تکان دادن تیوپها در دست مخلوط میگردید. نمونه ها را با دور 10000 rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ، بعد از سانتریفوژ سه فاز در میکروتیوب تشکیل میشود. فاز بالایی (Supernatant) یا آبی شفافتر است و حاوی DNA میباشد توسط سمپلر با دقت به یک میکرو تیوب جدید ۱.۵ میلی لیتری منتقل میشود. فاز میانی که بصورت لخته های شیری رنگ است شامل پروتئینها، چربیها و مواد سلولی دیگر است که توسط فنل لخته شده و فاز زیری هم خود فنل است که این دو فاز دور ریخته میشود. هم حجم محلول حاصل از مرحله قبل محلول فنل - کلرو فرم - ایزو آمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به نمونه اضافه و بمدت ۵ دقیقه و به آرامی مخلوط میگردید و با همان شرایط مرحله قبل مجدداً سانتریفوژ میگردید. پس از جدا سازی فاز رویی (Supernatant) و انتقال آن به میکروتیوب جدید، دوباره هم حجم محلول حاصل از مرحله قبلی کلروفرم خالص اضافه میشود و به آرامی تکان داده می شود و مجدداً سانتریفوژ انجام می گرفت که این عمل دو بار تکرار می شد (در این مرحله بقایای فنل که ماده ای باز دارنده است توسط کلروفرم به فاز زیرین رفته و حذف میگردد). پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید به میزان ۰.۱ حجم محلول حاصل از مرحله قبلی استات سدیم ۳ مولار و یا کلوروز منیزیوم ۱ مولار افزوده میگردد. سپس معادل ۲ برابر حجمش اتانول سرد ۹۶٪ به آن اضافه می شود. میکروتیوبهای حاوی محلول به آرامی با دست حرکت داده که رشته های DNA در این مرحله بدلیل وجود الکل خالص و آبگیری کم کم ظاهر میگرددند. میکروتیوبهای فوق به مدت یک شب (Over night) در فریزر ۲۰- و یا یک ساعت در فریزر ۸۰- قرار داده به این ترتیب میزان DNA بیشتری حاصل میشود. نمونه ها را به مدت ۱۰ دقیقه با دور 12000 rpm سانتریفوژ و در خانمه این مرحله DNA به شکل رسوب سفید رنگی (Pellet) در ته میکرو تیو بها دیده میشود. اتانول موجود در میکرو تیو بها را به آرامی دور ریخته و مابقی آن نیز با سمپلر تخلیه می گردید. مقدار ۲۰۰ μl الکل اتانول ۷۰٪ به رسوب افزوده شده تا بقایای املاح موجود در رسوب DNA با سانتریفوژ دور ریخته شوند. با خم کردن میکروتیو بها اتانول موجود در آنها به آرامی دور ریخته میشود و ما بقی نیز با سمپلر به دقت برداشته میشود در میکروتیوبها را باز و به حالت ایستاده در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده تا بقایای الکل موجود در نمونه ها تبخیر شود. در آخرین مرحله DNA حاصل را در ۲۰ μl آب دو بار تقطیر استریل حل کرده و بمدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده تا DNA کاملاً حل شود و سپس به یخچال ۴°C منتقل میشدند. تکثیر ژنها با PCR در دو مرحله و در دو میکروتیوب مجزا انجام شد. در مرحله اول PCR از جفت پرایمرهای قسمت انتهائی (3') از ژن (SSU rRNA) به نام پرایمر (forward primer) IR1  
 5'GCTGTAGGTTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT (reverse primer) (3')  
 IR2 primer) 5' GCGGGTAGTCCTGCCAAACTCAGGTCTG (3')  
 استفاده گردید (۱۴). در مرحله دوم از (Nested-PCR) پرایمر از روی هم افتادن ITS2 و قسمت انتهائی (3') از ژن (SSU rRNA) به نام پرایمر (forward primer) ITS1F (5' GCAGCTGGATCATTTTCC (3')  
 ITS2R4 (5' ATATGCAGAAGAGAGGAGGC (3')  
 در قسمت انتهائی (5') ITS2 - بود - مورد استفاده قرار گرفت (۳، ۱۱).

تمامی میکروتیوب ها را ورتکس کرده و بعد به مدت کوتاه سانتریفوژ می شدند (short spin). تمامی میکروتیوب ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داد می شد. به منظور کاهش دمای نمونه ها ، میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفتند. مقدار ۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (KOAC) ۸ مولار به تمامی میکروتیوب ها اضافه می گردید. مجدداً تمامی میکروتیوب ها ورتکس و سپس سانتریفوژ کوتاه انجام می شد. تمامی میکروتیوب ها را به مدت ۱۲۰-۴۵ دقیقه داخل یخ خرد شده قرار و بعد تمامی نمونه ها با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ می شد. محلول روئی موجود در میکروتیوب ها با استفاده از سمپلر جدا کرده و به میکروتیوبهای جدید و کدگذاری شده، منتقل می گردید. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ سرد (درون فریزر نگهداری شده) به تمامی میکروتیوبها اضافه می شد. نمونه ها در تمام طول شب (over night) در فریزر ۲۰°C - نگهداری می شد. صبح روز بعد تمامی نمونه ها از فریزر بیرون آورد تا پس از ۱۰ دقیقه در درجه حرارت معمولی آزمایشگاه از سرمای آن کاسته شود. تمامی میکروتیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می شد. محلول رویی میکروتیوب ها با کج کردن میکروتیوبها، دور ریخته می شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب DNA موجود در ته میکروتیوبها اضافه می گردید. میکروتیوب ها را تکان مختصری داده و با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شدند. مجدداً الکل رویی موجود در میکروتیوب ها با کج کردن میکروتیوبها دور ریخته می شدند. سپس میکروتیوبها را بصورت وارونه بر روی کاغذ خشک کن یا دستمال کاغذی کشیده تا هیچگونه الکلی در میکروتیوب ها باقی نمانده باشد. این مراحل ۳ بار تکرار می شد. در تمامی میکروتیوب ها را باز کرده و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده می شد (هدف از این کار خشک شدن و تبخیر کامل الکل موجود در داخل میکروتیوب ها است. به منظور جلوگیری از قرار گرفتن گرد و غبار درون تیوب ها می توان یک دستمال کاغذی بر روی آنها قرار داد). پس از کسب اطمینان از تبخیر شدن کامل الکل، مقدار ۲۵ میکرولیتر 1X TE buffer به تک تک میکروتیوبها اضافه می گردید. تمامی میکروتیوب را یک تکان مختصری داده و سپس سانتریفوژ کوتاه و این عمل ۴ بار تکرار می شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفتند. برای استفاده کوتاه مدت، نمونه ها در یخچال ۴°C و برای استفاده بلند مدت در فریزر ۲۰°C - قرار می گرفتند. در روش استخراج DNA با فنل کلرو فرم، ابتدا میکروتیوبهای حاوی بافت مورد نظر (گوشت بریده شده جونده) را از فریزر ۲۰°C - بیرون آورده و سپس آنها برای Freeze & Thaw به تانک ازلت و سپس به بن ماری ۶۵ درجه منتقل میگردد و طبق روش قبل این عمل سه بار تکرار می شد و بعد به میکروتیوبهای فوق ۱۰۰ μl از محلول PBS با PH=۷/۲ اضافه میگردد و با سانتریفوژ دور ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می شد. این کار ۳ بار تکرار می شد. در ادامه مقدار ۳۰۰ μl از بافر لیز کننده به میکروتیوب حاوی بافت مورد نظر اضافه میگردد (بهتر است اضافه کردن بافر لیز کننده کم کم باشد تا بافت کاملاً لیز شود). بعد از اضافه کردن بافر لیز کننده بوسیله پستلهای شیشه ای (Grinding Tissue) بافت را کاملاً لیز تا بتوان در ادامه کار DNA مطلوبتری داشت بعد میکروتیوبها آرام آرام مخلوط می شدند. مقدار ۳۰ μl پروتئیناز K (10-13mg/ml) به محلول فوق افزوده و به مدت یک شب در بن ماری ۵۵°C قرار داده میشود. جهت جلوگیری از ورود آب به میکروتیوبها و یا تبخیر بافر درب آنها با پارافیلیم بخوبی محکم میگردد. بعد از خارج نمودن نمونه ها از بن ماری به هر میکروتیوب مقدار ۳۰۰ μl فنل

نتایج حاصل از روشهای مورد نظر در جدول ۱ و نتایج حاصل از Nested-PCR بر روی ژن ITS-rDNA در نمودار ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توزیع جوندگان صید شده بر اساس نوع و روشهای

روش کار	محیط کشت		لام مستقیم میکروسکوپی		تزیق به Balb/C		Nest ed-PCR		روش یا فنل کلروفرم	Nest ed-PCR یا روش ISH-Horovize
	N.N.N				-	+	-	+		
مربوس پرسیکوس	۰	۲۹	۰	۲۹	۱	۲	۲	۲	۲	۳
س	۰	۲۹	۰	۲۹	۰	۲	۲	۲	۲	۳
مربوس نس	۰	۲۱	۰	۲۱	۰	۲	۲	۲	۲	۳
لیبیکوس	۰	۱۹	۰	۱۹	۰	۱	۱	۱	۱	۴
س	۰	۱۹	۰	۱۹	۰	۱	۱	۱	۱	۴
رومیوس	۰	۱۹	۰	۱۹	۰	۱	۱	۱	۱	۴
ایموس	۰	۱۹	۰	۱۹	۰	۱	۱	۱	۱	۴
جمع کل	۰	۶۹	۰	۶۹	۱	۶	۶	۶	۶	۱۰
لیشرمانیا مثبت	۰	۲۹	۰	۲۹	۱	۲	۲	۲	۲	۳
لیشرمانیا منفی	۰	۴۰	۰	۴۰	۰	۴	۴	۴	۴	۷



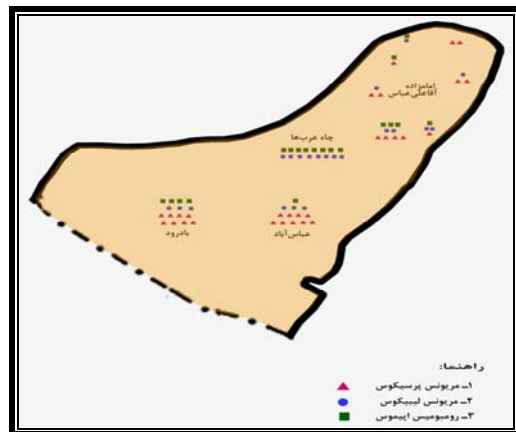
نمودار ۳. نتایج حاصل از Nested-PCR بر روی ژن ITS-rDNA به ترتیب از سمت چپ به راست: M مارکر ۱- کنترل مثبت ۲- کنترل منفی ۳- لیشرمانیا میجر در مربوس لیبیکوس ۴- مربوس لیبیکوس ۵- لیشرمانیا میجر در رومیوس ایموس ۶- رومیوس ایموس ۷- لیشرمانیا میجر در مربوس پرسیکوس ۸ - مربوس پرسیکوس ۹- رومیوس ایموس ۱۰- مربوس لیبیکوس .

اولین مرحله واکنش تکثیر که مجموعاً ۲۰ میکرولیتر و واکنش تکثیر DNA در داخل میکروتیوپ مخصوص با دیواره نازک انجام می گرفت و در داخل دستگاه PCR اپیدورف به نام (0.2 ml block) قرار داده می شد. از برنامه دمائی بدین شرح استفاده می شد: الف- ۹۴°C بمدت ۳ دقیقه برای جدا شدن رشته های الگو ب- ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه ج - C ۵۸° بمدت ۳۰ ثانیه د - ۷۲°C بمدت ۹۰ ثانیه (مرحله ب تا د ۳۷ بار تکرار می شد) م- ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه (برای اطمینان از ساخت کامل تمامی قطعات) ه- ۴°C تا زمان بررسی نمونه ها. مرحله دوم یعنی Nested-PCR در یک میکروتیوپ مجزا و واکنش تکثیر که مجموعاً ۲۰ میکرولیتر و با محتویات و حجم و مقدار مشابه مرحله اول بود جز اینکه از پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 و نیز یک میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول استفاده می شد. برنامه دمائی دستگاه PCR مشابه مرحله اول بود که شرح داده شد. در هر مرحله از PCR از کنترل منفی استفاده تا آلودگیهای احتمالی نیز مشخص شود. کلیه محصولات PCR بطور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند برای این منظور ابتدا محصول PCR تمیز و خالص سازی می شد و بعد یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسید آمینه با کیت ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه ( 373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems) مورد استفاده قرار گرفت. جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه ها و تنظیم توالی و مطابقت کردن نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار Sequencher™ 3.1.1 software (Gene Codes Corporation). برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic analysis using parsimony و یا PAUP\* بهره گرفته شد(۱۵و۱۶).

### یافته ها

در سال ۱۳۸۵ از ۴ منطقه شامل عباس آباد، بادرود، آقاعلی عباس و چاه عربها در مجموع ۴۱ سر جونده ود سال ۱۳۸۶ از همین مناطق در مجموع ۲۸ سر جونده صید گردید. پراکندگی بر حسب نوع جونده صید شده و محل صید در نقشه ۱ آمده است. از جوندگان صید شده ۴۲٪ مربوط به مربوس پرسیکوس، ۳۰٪ مربوس لیبیکوس و ۲۸٪ رومیوس ایموس می شد.

شکل ۱. منطقه روستایی امامزاده آقا علی عباس (ع) و جوندگان صید شده از مناطق مختلف آن در سال ۸۵ و ۸۶



## بحث

لیشمانیا میجر عامل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در ایران بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مخزن اصلی آن در ایران جونده رومبومیس اپیموس از موش های بزرگ گروه جربیلیده صحرائی می باشد که در مقالات متعدد محققین ایرانی بعنوان مخزن بیماری معرفی شده است (۲، ۴، ۵، ۱۰، ۱۸). گونه های *Rhombomys opimus* بیشتر در خاکهای مرطوب و نرم و همچنین در تپه های کوچک لانه میسازند. گونه های *Meriones Libicus* اغلب در کنار رومبومیسها لانه میسازند و حتی با آنها داخل یک لانه قرار دارند و گونه های *Meriones persicus* در تپه ماهور ها و سنگلاخها توانایی ساخت لانه دارند. با توجه به مطالعات از مقالات محققین در این زمینه انتظار بود که نمونه های زیادی در سال ۱۳۸۵ صید شود که از تیر ماه تا آبان ماه با تعداد زیادی تله های زنده گیر که معمولا بیش از ۱۰۰ عدد تله بود اقدام به صید جونده می شد و هر ماه به منطقه عزیمت و بین ۱۰ تا ۱۵ روز صید جونده انجام میگرفت که در سال اول ۴۱ سر جونده صید شد مجددا در سال ۱۳۸۶ اقدام به صید جونده شد که ۲۸ سر جونده صید شد که طی دو سال متوالی ۶۹ سر جونده صید گردید در حالی که محققین در این منطقه و دیگر مناطق تعداد خیلی بیشتر جونده صید نموده بودند. پرویزی و همکاران در طی دو سال یعنی ۱۳۷۲ و ۱۳۷۳ با تعداد محدودتری (۳۰ تله) و مدت کمتری ۱۰۶ سر جونده در منطقه ترکمن صحرا صید نمودند (۱۰). یعقوبی ارشادی و همکاران ۱۹۹۶ تعداد خیلی بیشتر جونده از منطقه ای که ما مطالعه می کردیم صید نمودند (۱۸). مجبعلی و همکاران ۲۰۰۴ البته طی حدود ۱۰ سال یعنی ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ از مناطق مختلف که ۵۶۶ سر جونده صید نمودند (۲). چرا در مطالعات ما تعداد صید جونده کم بوده است؟ عوامل متعدد مورد توجه قرار گرفت از جمله ممکن است تله ها مناسب نباشند، طعمه تله ها مناسب نباشند، نحوه تله گذاری درست نباشد، در محلها و یا کلنی های مناسب جوندگان تله گذاری انجام نشده باشد، در زمانهای مناسب تله گذاری انجام نشده باشد که همه موارد مورد بررسی مجدد قرار گرفت و هیچکدام از عوامل فوق دخیل نبوده است. لذا از مسئولین بهداشتی محلی در مورد کنترل جوندگان در طی سالهای اخیر سوال شد که متوجه شدیم انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران با همکاری مسئولین بهداشتی محلی طی پروژه ای نسبت به کنترل و کاهش جوندگان منطقه اقدام نموده اند و مسئولین بهداشتی منطقه نیز طی چند سال اخیر از سموم جونده کش جهت کنترل و از بین بردن جوندگان استفاده نموده اند که این می تواند یکی از علتهای باشد. شرایط جوی و آب هوایی از سالی به سال دیگر نیز فرق می کند و می تواند علت دیگر باشد. چون از اهداف برنامه ما صید جوندگان در نزدیکی روستاها و یا جاده های منتهی به روستاها بوده است و به دلیل کنترل جوندگان و استفاده از سموم جونده کش، ممکن است جوندگان از مناطق نزدیک به روستاها مهاجرت و اقدام به تشکیل کلنی در مناطق دور دست نموده باشند که می تواند علت دیگر باشد.

مطالعه روی انواع بیماری لیشمانیوز در ایران سابقه طولانی دارد. بخصوص استفاده از روشهای متداول آزمایشگاهی مثل نمونه برداری مستقیم و فیکس کردن روی لام و دیدن انگل با میکروسکوپ، نمونه برداری و تزریق به حیوان آزمایشگاهی، نمونه برداری و استفاده از محیط کشت که ما نیز از این روشها استفاده نمودیم متأسفانه با استفاده همزمان همه روشهای فوق

در هیچکدام از جوندگان آلودگی لیشمانیائی مشاهده نگردید. البته فقط در یک جونده در تزریق به حیوان آزمایشگاهی مشکوک به آلودگی لیشمانیائی شد و با استفاده از تکنیک الیزا الودگی لیشمانیائی در این یک جونده تأیید شد. از تکنیک های متداول آزمایشگاهی بیشتر در موارد انسانی بکار می رفته است و از مخازن حیوانی کمتر نمونه برداری صورت گرفته است. به دلیل برنامه کنترل بیماری در منطقه شاید بیماری در جوندگان کم شده است و یا اینکه تعداد انگل در آنها خیلی کم بوده است و به آن تعداد نبوده است تا در نمونه برداری مستقیم و فیکس کردن روی لام انگل با میکروسکوپ دیده شود، در نمونه برداری و تزریق به حیوان آزمایشگاهی بالا بیاید و یا با نمونه برداری و استفاده از محیط کشت در آن رشد کند. علی رغم استفاده از روشهای متداول آزمایشگاهی ذکر شده انگل لیشمانیا در جوندگان مشاهده نگردید. برای اولین بار DNA مستقیم از گوش جونده استخراج می شد. لذا ابتدا دو روشه مختلف استخراج DNA تست و بهترین روش انتخاب گردید. انتخاب نوع ژن که هم اختصاصی و هم حساس برای انواع لیشمانیاها باشد مهم بود که ژن ITS-rDNA انتخاب گردید (۳). یک قطعه از این ژن که شامل ITS1 و 5.8S rRNA و نیز یک قسمت کوچکی از ITS2 بود بطور حدود ۴۲۰ بیس پیر از این ژن تکثیر یافت (۱۹). برای تکثیر ژن از دستگاه PCR مدل اپندروف استفاده گردید. چون جوندگان از فیلد صید شده بودند و احتمال وجود انگل کم بود و یا تعداد انگل در جونده خیلی کم بود و در مطالعات متداول آزمایشگاهی نیز جوابها منفی بود لذا برای بالا بردن حساسیت و ردیابی انگل بجای PCR استاندارد از Nested PCR استفاده گردید (۱۷). از تمامی ۶۹ جونده صید شده از مناطق مورد مطالعه که DNA استخراج گردیده بود Nested PCR انجام شد که ۱۰ جونده دارای آلودگیهای لیشمانیائی بودند که پس از تعیین توالی با نمونه های به ثبت رسیده لیشمانیاها در GenBank مقایسه گردیدند. خوشبختانه در ۹ جونده بطور قطع لیشمانیا میجر تشخیص داده شد و لیشمانیا میجر در هر سه جونده صید شده مشاهده گردید. در مریونس پرسیکوس برای اولین بار لیشمانیا میجر از ایران جدا و با روشهای مولکولی تایپ گردید (۱۷). چون گزارشات معدودی از لیشمانیا تورانیکا در جوندگان در ایران بود و گزارشاتی از لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی از پشه خاکیهای ایران از اصفهان و ترکمن صحرا جدا و تایپ مولکولی شده بود انتظار بود که در جوندگان مورد مطالعه لیشمانیا های مذکور یافت شود را که در جوندگان صید شده مشاهده نشد (۲، ۳). شاید تعداد نمونه های مثبت کم بوده است و اگر تعداد جوندگان مثبت بیشتر می شد احتمال یافتن لیشمانیاهای فوق نیز بالا بود. Strelkova و همکاران در سالهای ۱۹۹۰ و ۲۰۰۱ نشان دادند که گونه های متفاوت انگل لیشمانیا با فعل و انفعالات داخلی باعث حفظ نگهداری آلودگی لیشمانیا میجر در جوندگان جربیلیده می شوند (۲۰، ۲۱). در ایران بیشتر مطالعات روی انواع لیشمانیوز با روش های متداول آزمایشگاهی بوده است اما در مخازن و ناقلین به علت مشکلات خاص و وحشی بودن مخازن و ناقلین استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی بسیار مشکل و امکان یافتن انگل دشوار است. با روش های معمول آزمایشگاهی و میکروسکوپی که فقط می شود پی به آلودگی لپتومونادی در جوندگان برد و نمی توان گفت که چه گونه ای از لیشمانیا است. لذا روش های تشخیصی مولکولی در مقایسه به گزارشات قبلی هم از حساسیت و هم از نظر تشخیص قطعی گونه لیشمانیا مهم تر هستند (۳).

## نتیجه گیری

روش های متداول آزمایشگاهی و روشهای مولکولی در تشخیص و ردیابی انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی لیشمانیوز جلدی روستائی با جزئیات و مفصل در مقاله بحث و بررسی گردیده است. روش های تشخیصی مولکولی در مقایسه با روش های متداول آزمایشگاهی حساس تر و نیز اختصاصی تر هستند. همچنین روش های مولکولی از نظر تشخیص قطعی گونه های لیشمانیا در جوندگان به روش های متداول آزمایشگاهی ارجحیت دارند. آلودگی های لیشمانیائی در مخازن به علت وحشی بودن جوندگان و مشکلات خاص نمونه برداری در میدان و انتقال به آزمایشگاه و نیز کم بودن تعداد انگل لیشمانیا در مخازن می توانند از محدودیت های تشخیص انگل با روش های متداول آزمایشگاهی باشد. استفاده از این روشها در مخازن حیوانی صحرائی، بسیار مشکل و امکان یافتن انگل دشوار است.

## تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه دکتر قاسم اکبری معاونت بهداشتی و رئیس مرکز بهداشت نطنز و همکارانشان ونیز تولیت آستان مبارک آقا علی عباس جهت فراهم نمودن مکان اقامت همکارانمان جهت جمع آوری نمونه در منطقه سپاسگزاری می نمایند. از آقای مهدی باغبان از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی که در جمع آوری نمونه جوندگان و از آقای سطوت کارشناس گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در نمونه برداری از جوندگان در الواژ انستیتو پاستور کمک شایانی نمودند تشکر می نمایند. از سرکار خانم مهین فرهمند عضو هیات علمی بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران که در تهیه محیط کشت و مشاهده لام مستقیم ما را یاری نمودند سپاسگزارند. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتو پاستور ایران به طرح مصوب ۲۶۳ تامین گردیده است.

## REFERENCES

1. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med. Vet. Entomol*; 1990; 4; 1-24
2. 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; 591-599
3. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*; 2008; 13; 1-13.
4. 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*; 1968; 61; 534-542.
5. Nadim A, Seyedi-Rashti M. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. *Acta Med. Iran*; 1971; 14; 99-106
6. Nadim A, Seyedi-Rashti MA, Mesgali A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara Iran. *J. Trop. Med. Hyg*; 1968; 71; 238-239
7. Mahboudi F, Abolhassani M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and differentiation of Iranian *Leishmania* species by PCR amplification of kDNA. *East Med. Health J*; 2001; 33; 596-598
8. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Schönian G, Farajnia S, Alimohamadian MH. *Leishmania major*: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop*; 2006; 98; 52-58
9. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SMH, Sharifi I. Characterization of *Leishmania* isolates in Iran: Serotyping with species specific monoclonal antibodies. *Acta Trop*; 2000; 75; 301-307
10. Parvizi P, Javadian E, Assmar M, Naddaf SR, Amirkhani A. A survey on the host reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara area, Iran. *Parasitol. Int*; 1998; 47; (Suppl.) 186

11. Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of *Leishmania major* in peridomestic Iranian sandflies: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop*; 2005; 93; 75-83
12. Evans D. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*. World Health Organization, Geneva; 1989; P: 1 – 157
13. Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Souza AA. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* (Diptera:Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*; 1991; 86; 41-49
14. Cupolillo E, Grimaldi Jr, G, Momen H, Beverly SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol*; 1995; 73; 145-155
15. Higgins DG, Thomson JD, Gibson TJ. CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program; 1997; Version 1.7.: [www.sgi.com/chembio/resources/clustalw/](http://www.sgi.com/chembio/resources/clustalw/)
16. Swofford DL. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods); 2002; version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
17. Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Ready PD, Farahmand F, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central of Iran. *Parasitol. Res*; in press
18. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebbali 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
19. Parvizi P, Gavvani AS, Davies CR, Courtenay O, Ready PD. Two *Leishmania* species circulating in the Kaleybar focus of 'infantile visceral leishmaniasis', northwest Iran: implications for deltamethrin dog collar intervention. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; in press
20. Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovsky EN, Dergacheva TI, Evans DA. Mixed leishmanial infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next. *Ann. Trop. Med. Parasitol*; 2001; 95; 811-819
21. Strelkova MV, Shurkhal AV, Kellina OI, Eliseev LN, Evans DA, Peters W, Chapman CJ, Leblancq SM, Van Eys GJJM. A new species of *Leishmania* isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*. *Parasitology*; 1990; 101; 327-335