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

پرویز پرویزی*[۱]، قاسم مرادی[۱،۲]، عارف امیرخانی[۳]

۱. Ph.D بیولوژی مولکولی با گرایش حشره شناسی پزشکی مولکولی، استادیارانستیتو 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 ازمایشگاهی و روشهای مولکولی در تشخیص و ردیابی انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی لیشمانیوز جلدی روستائی با جزئیات و مفصل در مقاله بحث وبررسی گردیده است. روش های تشخیصی مولکولی در مقایسه با روش های متداول ازمایشگاهی حساس تر و نیز اختصاصی تر هستند. همچنین روش های مولکولی از نظر تشخیص قطعی گونه های لیشمانیا در جوندگان به روش های متداول ازمایشگاهی 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 ازمایشگاهی 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 تشخیص، ITS-ribosomal DNA*

مقدمه

لیشمانیوز یکی از مهمترین بیماری های گرمسیری است که در انسان به اشکال جلدی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی مخاطی ظاهر می شود که در ایران دو نوع جلدی و احشائی شایع و نوع جلدی مخاطی تاکنون از ایران گزارش نشده است (۱و ۲). سالک به دو فرم روستایی(مرطوب) و شهری (خشک) دیده می شود که عامل آن ها بترتیب لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا 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 جربیلیده) به انسان انتقال می یابد(۵-۳).

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 مخازن و آگاهی از تغییرات ژنتیکی آن ها می‌تواند 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 ۸-۶). 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 (۶و۹). به تدریج این مطالعات به مناطق دیگر ایران گسترش پیدا کرد. در این مطالعات فقط روی آلودگی های لپتوموناوی کار می شد و انگل دقیقا جدا و تایپ نمی گردید. در اکثر مطالعات محققین در ایران رومبومیس اپیموس بعنوان مخزن اصلی بیماری در ایران گزارش گردیده است. در مطالعات محققان ایرانی در بعضی از مناطق ایران مریونس لیبیکوس 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 رومبومیس 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 هوریانه 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 رجاستان 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 لپتوموناوی 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 محقیقین 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 سروزیته موجود در گوش جونده نمونه تهیه و در محیط کشت N.N.N که حاوی آنتی بیوتیکهای استرپتو مایسین و پنی سیلین همراه سرم فیزیو لوژی 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 سروزیته موجوددر 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 ازبرداشت سروزیته از گوش جونده در داخل شیشه ساعت که از قبل مقدارحدود ۱ تا ۲ ml سرم فیزیولوژی به آن اضافه شده بود سروزیته با سرم فیزیولوژی مخلوط شده و بعد با سرنگ انسولین کشیده و مایع مورد نظر چند بار پر و خالی می شد تا سروزیته موجود با سرم فیزیولوژی کاملا مخلوط گردد. در ادامه، مخلوط مورد نظر به قاعده دم حیوان حساس ازمایشگاهی که موش BALB/C است تزریق می گردیدبرای استخراج DNA از دو روش 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 جه سانتی گراد) بمدت ۵-۳ 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 کارموجب لیز شدن نمونه مورد نظر شده (freez-thow) 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 (نبایستی 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 می‌شد.

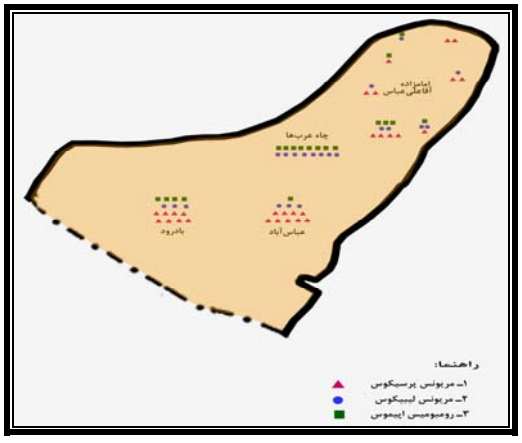
تمامی میکروتیوب ها را ورتکس کرده و بعد به مدت کوتاه سانتریفوژ می‌شدند (short spin) . تمامی میکروتیوب ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داد می شد. به منظور کاهش دمای نمونه ها ، میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفتند. مقدار ۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (KOAC) ۸ مولار به تمامی میکروتیوب ها اضافه می‌گردید. 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 می‌گردید. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ سرد (درون فریزر نگهداری شده) به تمامی میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. نمونه ها در تمام طول شب (over night) در فریزر $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری می شد. صبح روز بعد تمامی نمونه ها از فریزر بیرون آورد تا پس از ۱۰ دقیقه در درجه حرات معمولی آزمایشگاه از سرمای آن کاسته شود. تمامی میکروتیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد. 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 می‌گردید. میکروتیوب ها را تکان مختصری داده و با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. 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 می‌شد.درب 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 وتبخیر کامل الکل موجود در داخل میکروتیوب ها است. به منظور جلوگیری از قرارگرفتن گرد و غبار درون تیوب ها می‌توان 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 میکروتیوب ها اضافه می‌گردید. تمامی میکروتیوب را یک تکان مختصری داده و سپس سانتریفوژ کوتاه و این عمل ۴ بار تکرار می‌شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفتند. برای استفاده کوتاه مدت، نمونه ها در یخچال $۴^{\circ}C$ و برای استفاده بلند مدت در فریزر $-۲۰^{\circ}C$ قرار می‌گرفتند.در روش استخراج DNA با فنل کلرو فرم، ابتدا میکروتیوبهای حاوی بافت مورد نظر (گوش بریده شده جونده) را از فریزر $-۲۰^{\circ}C$ بیرون آورده و سپس آنها برای Freeze & Thaw به تانک ازت و سپس به بن ماری ۶۵ درجه منتقل میگردید 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 میگردید و با سانتریفوژ دور ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه ساتنریفوژ می شد . این کار ۳ بار تکرار می شد . در ادامه مقدار۳۰۰ µl از بافر لیز کننده به میکروتیوب حاوی بافت مورد نظر اضافه میگردید (بهتر است اضافه کردن بافر لیز کننده کم کم باشد تا بافت کاملا لیز شود). بعد از اضافه کردن بافر لیز کننده بوسیله پستلهای شیشه ای (Grinding Tissue) بافت را کاملا لیز تا بتوان در ادامه کار DNA مطلوبتری داشت بعد میکروتیوبها آرام آرام مخلوط می شدند . مقدار۳۰ µl پروتئیناز K (10-13mg/ml) به محلول فوق افزوده و به مدت یک شب در بن ماری $۵۵^{\circ}C$ قرار داده میشد. جهت جلوگیری از ورود آب به میکروتیوبها و یا تبخیر بافر درب آنها با پارا فیلم بخوبی محکم میگردید. بعد از خارج نمودن نمونه ها از بن ماری به هر میکروتیوب مقدار ۳۰۰µl فنل 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 میشد .فاز میانی که بصورت لخته های شیری رنگ است شامل پروتئینها, چربیها ومواد سلولی دیگر است که توسط فنل لخته شده و فاز زیری هم خود فنل است که این دو فاز دور ریخته میشد .هم حجم محلول حاصل از مرحله قبل محلول فنل – کلرو فرم – ایزو آمیل الکل به نسبت ۲۵:۲۴:۱ به نمونه اضافه و بمدت ۵ دقیقه و به آرامی مخلوط میگردید و با همان شرایط مرحله قبل مجدد 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 میشد و به آرامی تکان داده می شد و مجددا 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 کلرور منیزیوم ۱ مولار افزوده میگردید . سپس معادل ۲ برابر حجمش اتانول سرد ۹۶ ٪ به آن اضافه می شد. 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 میگردند. میکروتیوبهای فوق به مدت یک شب (Over night) در فریزر $-۲۰^{\circ}C$ و یا یک ساعت در فریزر $-۸۰^{\circ}C$ قرار داده به این ترتیب میزان DNA بیشتری حاصل میشد .نمونه ها را به مدت ۱۰ دقیقه با دور 12000 rpm سانتریفوژ و در خاتمه این مرحله DNA به شکل رسوب سفید رنگی (Pellet) در ته میکرو تیو بها دیده میشد . اتانول موجود در میکرو تیو بها را به آرامی دور ریخته و مابقی آن نیز با سمپلر تخلیه می گردید . مقدار۲۰۰ 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 میشد و ما بقی نیز با سمپلر به دقت برداشته میشد 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 ۲۰µl آب دو بار تقطیر استریل حل کرده و بمدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده تا DNA کاملا حل شود و سپس به یخچال $۴^{\circ}C$ منتقل میشدند.تکثیر ژنها با PCR در دو مرحله و در دو میکروتیوپ مجزا انجام شد. در مرحله اول PCR از جفت پرایمرهای قسمت انتهائی (´3) از ژن (SSU rRNA) به نام پرایمر (forward primer) IR1 بـــــــــــــــا نوکلئیـــــــــــــــدهای (5'GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT 3') و قسمت انتهائی (´5) از ژن (LSU rRNA) به نام پرایمر (reverse primer) IR2 بـــــــــــــا نوکلئیـــــــــــــدهای (5´ GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG 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 ITS1F (forward primer) بـــــا نوکلئیـــــدهای (5´ GCAGCTGGATCATTTTCC 3') و نیز از پرایمر بازگشت بنام ITS2R4 بـــــــا نوکلئوئیـــــــدهای (5´ ATATGCAGAAGAGAGGAGGC 3´) در قسمت انتهائی (´5) ژن ITS2 بـــــود مـــــورد اســـــتفاده قـــــرار گرفـــــت (۳، ۱۱).

اولین مرحله واکنش تکثیر کـه مجموعـا ۲۰ میکرولیتـر و واکـنش تکثیـر DNA در داخل میکروتیوپ مخصوص با دیواره نازک انجام مـی گرفـت و در داخل دستگاه PCR اپیدورف به نام (0.2 ml block) قرار داده مـی شد. از برنامه دمائی بدین شرح اسـتفاده مـی شـد: الـف- ۹۴°C بمـدت ۳ دقیقه برای جدا شدن رشته های الگو ب- ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیـه ج - C ۵۸° بمدت ۳۰ ثانیه د - ۷۲°C بمدت ۹۰ ثانیه (مرحله ب تا د ۳۷ بـار تکرار می شد) م- ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه (برای اطمینان از ساخت کامـل تمـامی قطعـات) ه- ۴°C تـا زمـان بررسـی نمونـه هـا.مرحلـه دوم یعنـی Nested-PCR در یک میکروتیوپ مجزا و واکنش تکثیر که مجموعا ۲۰ میکرولیتر و با محتویات و حجم و مقدار مشابه مرحله اول بود جز اینکـه از پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 و نیز یک میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول استفاده می شد. برنامه دمائی دستگاه PCR مشابه مرحلـه اول بود که شرحش 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 بـرای ایـن منظـور ابتـدا محصـول PCR تمیز و خالص سازی می شد و بعد یکصد نانوگرم از DNA خـالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسید آمینه بـا کیـت ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دسـتگاه (373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems مـورد اسـتفاده قـرار گرفت. جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه ها وتنظیم تـوالی و مطابقـت کـردن نوکلئوتیـدها بـا کرومـاتوگرافی هـر نمونـه، از نـرم افـزار Sequencher™ 3.1.1 software (Gene Codes Corporation). استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افـزار Phylogenetic analysis using parsimony و یـا *PAUP بهـره گرفته شد(۱۵و۱۶).

یافته ها

در سال ۱۳۸۵ از ۴ منطقه شامل عباس آباد، بـادرود، آقـاعلی عبـاس و چـاه عربها در مجموع ۴۱ سر جونده ود سال ۱۳۸۶ از همین مناطق در مجموع ۲۸ سر جونده صید گردید. پراکندگی بر حسب نـوع جونـده صـید شـده و محـل صید در نقشه ۱ آمده است. از جوندگان صید شـده ۴۲٪ مربـوط بـه مریـونس پرسیکوس، ۳۰٪ مریونس لیبیکوس و ۲۸٪ رومبومیس اپیموس می شد.

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



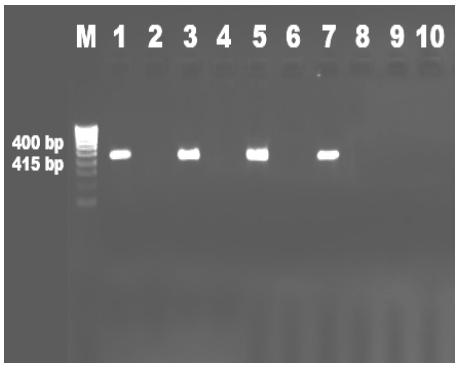
نتایج حاصل از روشهای مورد نظر در جدول ۱ و نتایج حاصل از Nested-PCR بر روی ژن ITS-rDNA در نمودار ۱ نشان داده شده است.

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

روش کار / گونه	محیط کشت N.N.N		لام مستقیم میکروسکپی		تزریق به Balb/C		Nested-PCR با روش فنل کلروفرم		Nested-PCR با روش ISH-Horovize	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
مریونس پرسیکوس	۰	۲۹	۰	۲۹	۱	۲۸	۲	۲۷	۳	۲۶
مریونس لیبیکوس	۰	۲۱	۰	۲۱	۰	۲۱	۲	۱۹	۳	۱۸
رومبومیس اپیموس	۰	۱۹	۰	۱۹	۰	۱۹	۴	۱۵	۴	۱۵
جمع کل	**۰**	**۶۹**	**۰**	**۶۹**	**۱**	**۶۸**	**۸**	**۶۱**	**۱۰**	**۵۹**

\+ لیشمانیا مثبت

ـ لیشمانیا منفی



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- لیشمانیا میجر در مریونس لیبیکوس ۴- مریونس لیبیکوس ۵- لیشمانیا میجر در رومبومیس اپیموس ۶- رومبومیس اپیموس ۷- لیشمانیا میجر در مریونس پرسیکوس ۸ - مریونس پرسیکوس ۹- رومبومیس اپیموس ۱۰- مریونس لیبیکوس .

بحث

لیشمانیا میجر عامل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در ایران بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مخزن اصلی آ ن در ایران جونده رومبومیس اپیموس از موش های بزرگ گروه جربیلیده صحرایی 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 Merinones 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). محبعلی 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 با شد 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 علتها 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 روستا ها و یا جاده های منتهی به روستا ها 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 متاسفانه 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 وبا استفاده از تکنیک الیزا الودگی لیشمانیائی در این یک جونده تائید 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 لیشمانیا ها 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 انتظاربود که در جوندگان مورد مطالعه لیشمانیا های مذکور یافت شود را که در جوندگان صید شده مشاهد نشد (۲، ۳). شاید تعداد نمونه های مثبت کم بوده است و اگر تعداد جوندگان مثبت بیشتر می شد احتمال یافتن لشمانیاهای فوق نیز با لا 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 ازمایشگاهی بوده است اما در مخازن و ناقلین به علت مشکلات خاص و وحشی بودن مخازن و ناقلین استفاده از روش های متداول ازمایشگاهی 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 ازمایشگاهی و روشهای مولکولی در تشخیص و ردیابی انگل لیشمانیا در مخازن حیوانی لیشمانیوز جلدی روستائی با جزئیات و مفصل در مقاله بحث وبررسی گردیده است. روش های تشخیصی مولکولی در مقایسه با روش های متداول ازمایشگاهی حساس تر و نیز اختصاصی تر هستند. همچنین روش های مولکولی از نظر تشخیص قطعی گونه های لیشمانیا در جوندگان به روش های متداول ازمایشگاهی 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 ازمایشگاهی 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 مرکزبهداشت نطنز و همکارانشان ونیزتولئیت 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 leishmaniases: 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 Turkemen 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 Turkemen 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/

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, 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

19. Parvizi P, Gavgani 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 optimus: 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