بررسی و تعیین آلودگی‌های لیشمانیائی در جوندگان مخزن بیماری لیشمانیوز جلدی روستائی در منطقه ترکمن صحرا، شهرستان گنبد، استان گلستان

*دکتر پرویز پرویزی(Ph D)[1] - مجتبی هدایتی(MSc)[1و2]

*نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی

پست الکترونیک: parp@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۸/٦/٤

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز جلدی روستایی، بیماری مناطق گرمسیری است که عامل آن لیشمانیا ماژور(مِیجر)ناقل آن پشه خاکی و مخازن آن جوندگان هستند. ترکمن صحرا پس از اصفهان، دومین منطقه مهم اندمیک این بیماری در ایران است.

هدف: تعیین عامل بیماری در مخازن بیماری است که حاصل از مشکلات صید مخزن، دوری منطقه مورد مطالعه از مناطق شهری، مشکلات نمونه‌برداری و روند های بعد از آن که حتی با روشهای متداول آزمایشگاهی در سالهای اخیر از منطقه انجام نشده است.

مواد و روش‌ها: برای صید جونده از تله های زنده‌گیر و خیار و خرما برای طعمه گذاری استفاده شد. بخشی از سروزیته گوش جوندگان به محیط کشت NNN انتقال داده شد، بخشی برای تهیه لام مستقیم و جستجوی آماستیگوت‌های انگل و بخشی دیگر به‌صورت سوسپانسیون برای تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی(BALB/c) بکار رفت و نیز از بیوپسی استفاده شد.

نتایج: از ٤٠ سر جونده صید شده ۲۷ سر رومبومیس اُپیموس، ۱۲ سر مریونس لیبیکوس و ۱ سر مریونس پرسیکوس تشخیص داده شدند. از این تعداد، ۵ سر جونده در آزمایش‌های متداول آزمایشگاهی آلودگی لیشمانیایی داشتند که ۳ سر جونده متعلق به مریونس لیبیکوس، یک سر رومبومیس اُپیموس و ۱ سر مریونس پرسیکوس بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: با این یافته‌های جدید بایدعلاوه بر رومبومیس اُپیموس، مریونس لیبیکوس و مریونس پرسیکوس هم به‌عنوان مخازن بیماری در منطقه مورد مطالعه مد نظر قرار گیرند.

کلید واژه‌ها: لیشمانیای ماژور/ استان گلستان

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۲، صفحات: ۳۸-۳۰

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری با تظاهرات بالینی بسیار متفاوت است که واکسن مؤثری نداشته و درمان هم بتنهایی تاثیر کمی بر آن دارد(۱). لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گرمسیری است که در انسان به شکل‌های جلدی(سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی- مخاطی ظاهر می‌شود. دو نوع جلدی و احشائی در ایران شایع ولی نوع جلدی- مخاطی آن تاکنون از ایران گزارش نشده‌است(۱و۲). سالک به دو فرم روستایی(مرطوب) و شهری (خشک) دیده می‌شود که عامل آنها به‌ترتیب لیشمانیا ماژور (میجر)و لیشمانیا تروپیکا هستند. لیشمانیوز جلدی روستایی به‌علت طبیعت زئونوز آن اهمیت بیشتری دارد. بسیاری از نواحی روستایی ۱۵ استان از ۳۰ استان ایران کانون اندمیک لیشمانیوز جلدی روستایی(ZCL) هستند(۳). گستره‌ی این بیماری از ۴۵ درجه عرض شمالی تا ۳۲ درجه جنوبی است. پراکندگی این بیماری ارتباط زیادی با اکولوژی و انتشار پشه خاکی ها به عنوان ناقل بیماری و جوندگان به عنوان مخزن بیماری دارد. این بیماری از ۹۰ کشور جهان گزارش شده که شامل کشورهای گرمسیری و جنوب اروپا است(۶-۴).

این بیماری جزء ۱۰ بِیماری مهم مناطق گرمسیری در جهان و ۳ بیماری اول مورد بررسی در مرکز تحقیقات بیماری های مناطق گرمسیری (TDR) در سازمان بهداشت جهانی (WHO) است که نوپدید، باز پدید و غیر قابل کنترل هستند. حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به آن بوده و از این تعداد ۱۴ میلیون نفر به آن مبتلایند(۷). ۹۰٪ موارد لیشمانیوز جهان از ۷ کشور افغانستان، ایران، الجزایر، پرو، برزیل، عربستان و سوریه گزارش شده است(۸). از جمله کانون‌های این بیماری

۱. تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی ۲. لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

می‌توان به اصفهان و ترکمن صحرا اشاره کرد. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران، لیشمانیا میجر *Leishmania major* است که توسط پشه‌خاکی‌های فلوبتومینه منتقل و در مخازن جونده‌ی خانواده‌ی جربیلیده کلونیزه می‌شود(۹).

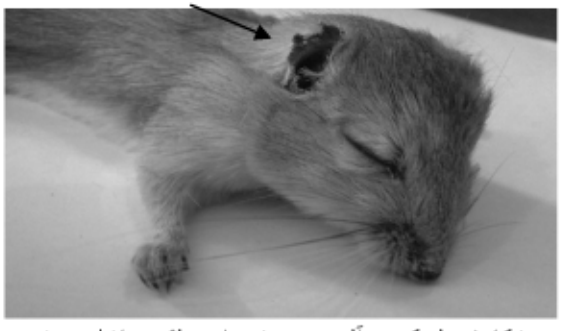
انگل لیشمانیا میجربه‌طور گسترده در منطقه‌ی پالئارتیک و اتیوپی و همچنین در ناطق شمالی و جنوبی صحرا به سمت شمال کنیا و از جنوب به سمت عربستان و همچنین جنوب عراق و ایران و ایالت‌های آسیای مرکزی، ترکمنستان، ازبکستان و شمال افغانستان دیده می‌شود. گسترش آن در مرزهای جنوب شرقی ایران به سمت پاکستان، بلوچستان و مرز هندوستان در ناحیه‌ی Rajastan در نواحی خشک و نیمه خشک است(۱۰). فلوبتوموس پاپاتاسی فراوان‌ترین ناقل لیشمانیا میجر است. اما در مناطقی از هندوستان و صحرا، دوگونه *P. dobosqi* و *P. salehi* در انتقال لیشمانیا میجربین جوندگان و انسان دخالت دارند(۱۱و۱۲). در صحراهای آسیای مرکزی، جربیل‌های بزرگ در کلون‌های زیاد درون لانه‌های پرپیچ و خم که پناهگاه بسیار خوبی برای پشه خاکی‌ها و تخم‌ریزی آنها نیز هست، زندگی می‌کنند. در انتهای فصل پاییز که هنگام انتقال بیماری است، تقریباً تمام جربیل‌ها آلوده هستند(۱۳). معمولاً آنها کلونی‌های خود را در قسمت‌هایی از خاک که عمق زیادی دارد و شرایط آب و هوایی آن نیز مناسب است می‌سازند. پراکندگی جوندگان نسبت به ناقلان لیشمانیوز بیشتر است به‌طوری‌که گستره‌ی آنها به سمت شمال آسیای مرکزی معرف حضور دیگر گونه‌های *L. gerbili* و *L. turanica* است(۱۴).

مطالعه در مورد بر روی آلودگی لیشمانیائی جوندگان در ایران از سال ۱۹۵۳ در شمال شرقی کشور در منطقه ترکمن صحرا و لطف آباد شروع شد(۱۵). بتدریج این مطالعات به مناطق دیگر ایران گسترش داده شد. در اکثر مطالعات در ایران، رومبومیس اپیموس به‌عنوان مخزن اصلی شناخته شده(۱۵و۱۶) ولی برخی مناطق، مریونس لیبیکوس به‌عنوان مخزن ثانویه معرفی شده است(۱۷). در ابردژ ورامین در استان تهران و مناطق دوردست با حضور اماکن انسانی، آلودگی طبیعی لیشمانیائی در جونده رومبومیس اپیموس دیده‌شده‌بود ولی نوع انگل لیشمانیا را مشخص نکرده بودند(۱۸). در مناطق جنوب و جنوب غربی ایران، هم مرز عراق شامل سومار تا خلیج فارس که شامل همه استان خوزستان و بخشی از استان‌های ایلام، بوشهر و هرمزگان می‌شود، تاترا اندیکا به‌عنوان مخزن لیشمانیوز نوع روستائی شناخته شده‌است(۱۹). در مناطق جنوب شرقی ایران شامل مناطق جنوبی استان بلوچستان، دشت یاری، کنارک و چابهار. لیشمانیوز جلدی روستائی در این مناطق شبیه نوع روستائی گزارش شده از رجاستان هند است (۲۰).

هدف این مطالعه تعیین گونه‌های جوندگان در مناطق بومی لیشمانیوز جلدی روستائی در منطقه ترکمن صحرا و شهرستان گنبد در استان گلستان بوده‌است و این که چه گونه‌هائی از این جوندگان آلودگی لپتومونادی دارند.

مواد و روش‌ها

صید جونده با تله‌های زنده گیر سیمی و چوبی در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۷در دو نوبت و از ۶ منطقه اندمیک لیشمانیوز جلدی روستائی منطقه ترکمن صحرای شهرستان گنبد استان گلستان شامل شوردگش، دانشمند، جعفربای، داشلی برون، یلمه سالیان و اوخی تپه انجام شد. خیار و خرما به‌عنوان طعمه بکار رفت(شکل ۱).



شکل۱: م.لیبیکوس آلوده صید شده از منطقه‌ی داشلی‌برون

بعد از صید جونده و انتقال به حیوانخانه، نمونه‌گیری انجام شد. نوع گونه جونده توسط کلیدهای معتبر

تشخیصی و استفاده از خصوصیات منحصر به فرد هر گونه از قبیل نوع و تعداد شیارهای دندان‌های پیشین، طول و اندازه گوش، وجود مو در کف پاها، رنگ ناخن دست و ...تشخیص داده می‌شد. ابتدا جونده نمونه با اتر یا کلروفرم بیهوش می‌شد. برای این منظور ابتدا پنبه‌ای را آغشته به اتر کرده و داخل یک ظرف سر بسته قرار می‌دادند، سپس جونده توسط پنس‌های بلند مخصوص از قسمت دم گرفته وبه ظرف سربسته حاوی پنبه ی آغشته به اتر منتقل می شد. پس از بیهوشی، گوش جونده را سمباده کشیده و با اسکالپل از سروزیته آن، نمونه تهیه شده و در محیط کشت N.N.N که حاوی آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین+ سرم فیزیو لوژی است کشت داده و محیط کشت به انکوباتور ۲۷-۲۵ درجه منتقل می‌شد. بعد از ۷۲-۴۸ ساعت در زیر میکرو سکوپ محیط کشت از نظر وجود اشکال لپتوموناد که کاملاً متحرک هستند بررسی می شد.

بررسی اشکال تا مدت یک ماه قابل انجام است که در صورت مشاهده‌نشدن لپتومونادها در زیر میکروسکوپ نتیجه منفی گزارش می‌شود. همچنین، از سروزیته گوش جونده مخصوصاً جوندگانی که به وضوح آثار بیماری در آنها مشهود بود، با سرنگ انسولین یا اسکالپل جراحی بعد از استریل کردن کامل، نمونه‌برداری می‌شد. سپس، نمونه روی سطح لام میکروسکوپی به‌صورت لایه‌ای خیلی نازک کشیده شده و صبر می‌کردند تا نمونه‌ها بدون استفاده از شعله خشک شوند اجسام آماستیگوت و پس از طی مراحل رنگ‌آمیزی با گیمسا، در زیر میکروسکوپ با عدسی چشمی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون، بدون لامل جستجو می‌شدند. برای تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی نیز گوش یا محل ضایعه سمباده زده شده و با اسکالپل استریل خراش داده‌می‌شد و از داخل کناره‌های گوش یا محل ضایعه سروزیته برداشت می‌شد. حتی‌الامکان سعی می‌شد که خون از محل نمونه‌گیری بیرون نیاید. سپس سروزیته به شیشه ساعت که از قبل حدود ۱ تا ml۲ سرم فیزیولوژی در آن ریخته شده‌بود اضافه و مخلوط می‌شد. سپس، این مایع با سرنگ انسولین کشیده و چند بار پر و خالی می شد تا سروزیته با سرم فیزیولوژی کاملاً مخلوط شود. در ادامه، این مخلوط به انتهای قاعده دم حیوان حساس آزمایشگاهی یعنی موش Balb/C تزریق می‌شد که البته محل تزریق از قبل با الکل ضدعفونی شده‌بود البته، به‌جای قاعده دم می‌توان نمونه را به کف پای حیوان هم تزریق کرد. سپس، حیوان حساس Balb/C در شرایط مطلوب حیوان خانه از نظر دما و غذا نگهداری و هر سه روز یک بار محل تزریق به دقت بررسی می‌شد. بررسی تا سه ماه ادامه می‌یافت که در صورت مثبت‌شدن، ابتدا در محل تزریق یک ندول کوچک ظاهر شده و در ادامه زخم گسترش یافته و بزرگ‌تر می‌شود که با مشاهده این حالت از محل زخم بخصوص از کناره‌های آن نمونه‌برداری و پس از آن دوباره تمام این مراحل از جمله کشت در محیط N.N.N انجام می‌شد. در صورت رشد انگل در این محیط می‌توان از این انگل‌ها برای PCR هم استفاده کرد. سرانجام با تزریق به Balb/Cهای دیگر و نهایتاً تهیه لام، موارد مثبت، دوباره تائید می‌شدند.

برای تهیه‌ی بیوپسی از حیوان حساس که سوسپانسیون سروزیته‌ی تهیه شده از جونده‌ی مخزن وحشی به آن تزریق شده‌بود، ابتدا جانور را با اتر بیهوش کرده، پس از تشریح، نمونه از محل ضایعه، کبد، طحال و گره‌های لنفاوی جانور به محیط کشت NNN انتقال می‌یافت و پس از ۷۲-۴۸ ساعت با میکروسکوپ معکوس برای مشاهده‌ی پروماستیگوت‌های‌انگل و دیدن اشکال شاخص اجسام روزت، به جستجوی محیط کشت پرداخته می‌شد. بخشی از بیوپسی‌ها را روی لام قرار داده و با فشارلام دیگر گستره تهیه می‌شد. پس از رنگ‌آمیزی نمونه با گیمسای ۱۰ درصد آماستگوت‌های انگل جستجو می‌شد.

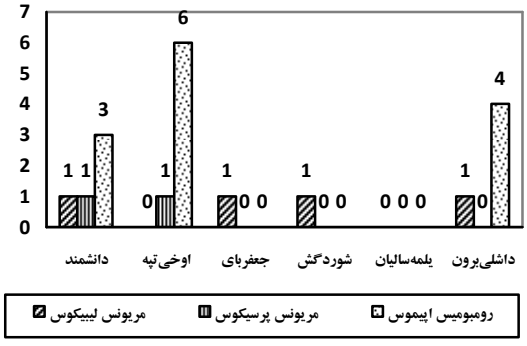
نتایج

توزیع جغرافیایی جوندگان صید شده در مناطق مختلف تحت مطالعه:

در مرداد ماه سال۱۳۸۷در مناطق روستایی منطقه ترکمن صحرای شهرستان گنبد کار صید جوندگان، با عزیمت به منطقه و شناسایی لانه‌های فعال جوندگان آغاز شد. کلونی‌های فعال و اطراف منطقه‌ی بررسی تله‌گذاری شد. بخش‌های مختلف این منطقه از جمله بیابان‌های اطراف شورگدش، دانشمند، جعفربای، یلمه سالیان، داشلی برون و اوخی تپه تحت پوشش قرار گرفتند. نتیجه‌ی صید جوندگان در شهریور ماه سال ۸۷ تعداد ۳۱سر جونده بود. جوندگان صید شده از روی کلید تعیین گونه شدند که به قرار زیر بود: از ۳۱ سر جونده صید شده، ۱ سر مریونس پرسیکوس، ۱۰سر مریونس لیبیکوس و ۲۰ سر رومبومیس اپیموس تشخیص داده شد.

در ادامه صید جونده در آبان و آذر ۸۷، مجدداً به منطقه عزیمت و لانه فعال جوندگان شناسایی شد. لازم به ذکر است که اغلب لانه‌های قبلی جوندگان غیر فعال شده بودند زیرا یک اصل در زندگی جوندگان آن است که آنها به‌طور مرتب محل زندگی خود را عوض می‌کنند. این بار ۹ سر جونده صید شد که گونه های آنها به قرار زیر تشخیص داده شدند:

از ۹ سر جونده صید شده ۲ سر مریونس لیبیکوس و ۷ سر رومبومیس اپیموس بودند(نمودار۱).



نتایج حاصل از تهیه لام میکروسکوپی از سروزیته گوش جوندگان: از سروزیته محل سمباده‌زنی گوش جوندگان با اسکالپل استریل نمونه‌برداری و از آن به‌صورت یک لایه نازک بر لام میکروسکوپی اسلاید تهیه شد. پس از فیکساسیون با متانول با گیمسای ۱۰ تا ۲۰٪ رنگ‌آمیزی شد. برای اطمینان از هر جونده ۲ لام تهیه می‌شد که به دو صورت تهیه ی گسترش واز سروزیته و گسترش مهری(لکه‌ای) بود.

بعد از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و پس از خشک‌شدن لام‌ها، برای یافتن انگل در زیر میکروسکوپ بررسی می‌شدند که نتیجه بررسی در ٤ مورد مثبت بود که محل آن بر اساس ترتیب صید با کد شماره‌گذاری مشخص شد که اشکال آماستیگوت در داخل ماکروفاژها و خون محیطی دیده می‌شدند (شکل۲)٤ جونده مثبت شامل سه مریونس لیبیکوس با کدهای TR01, TR02, TR40 و یک مریونس پرسیکوس با کد TR28 بودند.

نتایج حاصل از کشت سروزیته جوندگان در محیط کشت N.N.N: سروزیته‌ی گوش تمام جوندگانی که زنده صیدشده و تا هنگام انتقال به آزمایشگاه زنده مانده بودند را در محیط N.N.N کشت داده و بعداز ٤٨–٧٢ ساعت در زیر میکروسکوپ اجسام روزت یا شکل‌های پروماستیگوت جستجو می‌شد. نتیجه بررسی کشت سروزیته جوندگان در محیط کشت N.N.N در ٤ مورد مثبت بود. ٤ جونده مثبت شامل دو مریونس لیبیکوس با کدهای TR01, TR40 و یک رومبومیس اپیموس با کد TR34 و یک مریونس پرسیکوس با کد TR28 بودند.

نتایج از تزریق سروزیته به حیوان حساس آزمایشگاهی (Balb/c): در ۲ مورد پس از تزریق سروزیته گوش جونده صحرائی به انتهای قاعده دم حیوان حساس آزمایشگاهی(Balb/c) زخم در محل تزریق، زخم در حیوان حساس بوجود آمد (شکل ۳). نمونه از محل این زخم‌ها در شرایط پاک به محیط کشت انتقال یافت و حضور انگل‌ها در محیط کشت پس از چند روز با میکروسکوپ invert بررسی شد. ۲ جونده مثبت شامل یک مریونس لیبیکوس با کد TR01 و یک رومبومیس اپیموس با کد TR34 بودند.

نتایج بیوپسی طحال، کبد و گره‌های لنفاوی و زخم موارد مثبت حیوان حساس آزمایشگاهی (Balb/c): بیوپسی طحال، کبد، گره‌های لنفاوی و زخم موارد مثبت حیوان حساس آزمایشگاهی (Balb/c) مجدداً در شرایط

پاک به محیط کشت انتقال داده شد. پس از چند روز حضور انگل ها در محیط کشت با میکروسکوپ invert بررسی شد ۲ جونده مثبت شامل یک مریونس لیبیکوس با کد TR01 و یک مریونس پرسیکوس با کد TR28 بودند.

موارد مثبت لیشمانیائی جوندگان صید شده از ترکمن صحرا با روش‌های مختلف آزمایشگاهی با جزئیات در جدول ۱ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

جدول۱: جدول موارد مثبت لیشمانیا در جوندگان مورد مطالعه با روش‌های مختلف

انواع روش‌ها / نوع جونده	تزریق به BALB\c		تهیه لام		انتقال به محیط کشت		بیوپسی		تعداد کل مثبت‌ها با احتساب گونه‌جونده
	تعداد کل تزریقی	موارد مثبت	لام‌های تهیه شده	موارد مثبت	کشت‌های تهیه‌شده	موارد مثبت	کل موارد	موارد مثبت	
Rhombomis Opimus	٦	(TR34)۱	٦	-	٦	(TR34)۱	-	-	۱
Meriones libycus	٤	(TR01)۱	٤	(TR01-02-40)۳	٤	2 (TRo1-40)	(TR01)۱	۱	۳
Meriones persicus	-	-	۱	(TR28)۱	۱	(TR28)۱	۱	(TR28) ۱	۱

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیا میجر عامل لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران و مهم‌ترین عامل آن است و مخازن آن در ایران موش‌های بزرگ گروه جربیلیده صحرایی هستند که در مقاله‌های متعدد محققان ایرانی به‌عنوان مخزن بیماری معرفی شده‌اند. رومبومیس اپیموس بیشتر در خاک‌های مرطوب و نرم و همچنین در تپه‌های کوچک لانه می‌سازد. مریونس لیبیکوس اغلب در کنار رومبومیس لانه می‌سازد و حتی همراه با آنها داخل یک لانه می‌تواند قرار بگیرد. مریونس پرسیکوس در تپه ماهورها و سنگلاخ‌ها نیز توانایی ساخت لانه دارند(۲۱). بعد از شناسائی لانه‌های جونده فعال، در لانه‌های مناسب، صید با تله‌های زنده‌گیر اقدام می‌شد. در اکثر مطالعات محققان در ایران، رومبومیس اپیموس به‌عنوان مخزن اصلی بیماری گزارش شده(۲۱و۲۲). ولی در بعضی مناطق مریونس لیبیکوس مخزن ثانویه بوده‌است. این دو جونده حتی در بعضی از مناطق ایران بخصوص مناطق جنوبی و مرکزی که لیشمانیوز جلدی روستائی شایع است مخزن لیشمانیا میجربوده است. البته در مناطق ترکمن صحرا، لطف‌آباد و سرخس هم مرز ترکمنستان معرفی گردیده، در اسفراین در استان خراسان، بکران در استان سمنان، ابرقو در استان یزد، تبریز و استهبان در استان فارس، انگل لیشمانیا از این دو جونده جدا شده‌است و به نظر می‌رسد که باید لیشمانیا میجرباشد (۲۳و۲۴). در ابردژ ورامین در استان تهران، در مناطق دور از اماکن انسانی آلودگی طبیعی لیشمانیائی در رومبومیس اپیموس یافت شده ولی نوع انگل لیشمانیا در آنها مشخص نشده‌است. در مناطق جنوب و جنوب غربی ایران، هم مرز با عراق از سومار تا خلیج فارس شامل همه استان خوزستان، قسمتی از استان‌های ایلام، بوشهر و هرمزگان، تاترا اندیکا به‌عنوان مخزن لیشمانیوز نوع روستائی شناخته شده‌است. در مناطق جنوب شرقی ایران مخزن اصلی بیماری مریونس هوریانه است و این مناطق شامل مناطق جنوبی استان بلوچستان، دشت یاری، کنارک و چابهار است. لشمانیوز جلد روستائی در این مناطق شبیه لیشمانیوز جلدی روستائی گزارش شده از مناطق راجستان هند است (۲۴و۲۵).

از هدف‌های این مطالعه تشخیص گونه‌های جوندگان در مناطق بومی لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ترکمن

صحرا، گونه‌های آلوده لپتومونادی و تعیین قطعی وجود انگل لیشمانیا در جوندگان این منطقه بوده است.

پرویزی و همکاران طی سال‌های ۱۳۷۲ و ۱۳۷۳، ۱۰۶ سر جونده در منطقه ترکمن صحرا صید کرده و باروش‌های متداول آزمایشگاهی، به بررسی آلودگی لیشمانیائی پرداختند. یعقوبی ارشادی و همکاران، در سال ۱۹۹۶، آلودگی لیشمانیائی در جوندگان منطقه نطنز را مطالعه کرده و متعاقباً پرویزی وهمکاران در سال ۲۰۰۸ از این منطقه در سه گونه مختلف جونده آلودگی لیشمانیائی گزارش کردند(۹ و۱۳). محبعلی و همکاران در سال ۲۰۰۴ البته طی حدود ۱۰ سال یعنی از سال ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ با بررسی ۵۶۶ سر جونده صید شده به آلودگی لیشمانیائی پرداختند(۲۶).

مطالعه بر انواع لیشمانیوز در ایران سابقه‌ای طولانی دارد. بخصوص استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی مثل نمونه‌برداری مستقیم و ثبوت روی لام و دیدن انگل زیر میکروسکوپ، نمونه‌برداری و تزریق به حیوان آزمایشگاهی، نمونه‌برداری و استفاده از محیط کشت و بیوپسی که در این مطالعه نیز بکار رفته و در ۵ سر جونده، آلودگی لیشمانیائی نشان داد. لیشمانیا میجر با هر ۴ روش بکار رفته مورد مطالعه در منطقه ترکمن صحرا در سه گونه مختلف جونده‌ها برای اولین بار است که گزارش می‌شود که این یافته باید مورد توجه محققان این رشته و نیز مراکز بهداشتی، درمانی و دانشگاهی قرار گیرد. روش‌های متداول آزمایشگاهی بیشتر در موارد انسانی بکار رفته و از مخازن حیوانی کمتر نمونه‌برداری شده‌است. در مقایسه به مطالعات پرویزی و همکاران طی سال‌های ۱۳۷۲ و ۱۳۷۳ که موارد مثبت لیشمانیائی در جوندگان منطقه را بالای ۵۰ درصد گزارش کرده‌بود در سال‌های اخیر شاید به دلیل اجرای برنامه کنترل بیماری در منطقه باشد که بیماری در جوندگان کم شده یا تعداد انگل در آنها به آن اندازه نبوده که در نمونه‌برداری مستقیم ثبوت روی لام، انگل زیر میکروسکوپ دیده شود یا در نمونه‌برداری و تزریق به حیوان آزمایشگاهی بالا بیاید یا با نمونه برداری و کشت در آن رشد کند.

براساس ردیابی و یافت منحصراً انگل لیشمانیا درجوندگان

تنها می‌توان نتیجه گرفت که حداقل ۳ گونه جونده در مناطق شیوع لیشمانیوز جلدی ایران مخزن بیماری باشند و گاهی یک یا بیش از یکی از انگل‌های لیشمانیای گروه پستانداران یا جربیلیده‌ها را دارا هستند(۲۷). با توجه به میزان آلودگی لیشمانیای‌های متنوع گروه جربیلیده می‌توان این ایده را مطرح ساخت که بیش از یکی از این جوندگان شامل رومبومیس اپیموس، مریونس لیبیکوس و مریونس پرسیکوس مخزن لیشمانیا ماژور و دیگر لیشمانیاهای احتمالی پستانداران باشند. با توجه به ۳ مورد در مریونس لیبیکوس در برابر یک مورد مثبت در رومبومیس اپیموس، جونده گونه مریونس لیبیکوس را می‌توان مخزن اصلی این بیماری در این منطقه محسوب کرد. به‌طور قطع، نیاز به مطالعه بیشتر در آینده وجود دارد تا مخزن اصلی بیماری در منطقه از بین این سه جونده تایید قطعی و ثابت شود. شاید بعضی از این جوندگان در یک منطقه خاص نقش مخزن اصلی را ایفا کنند ولی در منطقه‌ای دیگر به عنوان مخزن ثانویه مطرح باشند و همچنین لیشمانیای دیگری در جوندگان یافت شده که برای انسان بیماری‌زا نیست ولی قادر است چرخه این لیشمانیا می‌تواند سیکل زندگی لیشمانیا میجررا در جوندگان مخزن تقویت‌کند یا به‌نوعی تحت تاثیر قراردهد. به‌نظر می‌رسد که در مناطق شمالی ایران بیشترین انتقال لیشمانیا میجر، لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی در داخل یا نزدیک لانه جوندگان موش‌های صحرائی بزرگ رومبومیس اپیموس اتفاق می‌افتد. لانه این جوندگان پناهگاه لازم را برای بسیاری از گونه‌های پشه خاکی و پستانداران مخزن و نیز خزندگان فراهم می‌کند که زمینه‌ساز پیدایش جایگاه مناسب با خطر بالای انتقال انگل در پستانداران مخزن و مارمولک‌ها است(۹ و۲۷).

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه آقای دکتر طاهرخانی استاد دانشگاه علوم پزشکی گرگان و آقای دکتر بدیعی معاون بهداشتی و رئیس مرکزبهداشت گنبد و همکارانشان در فراهم ساختن مکان اقامت همکاران طرح برای جمع‌آوری نمونه در منطقه سپاسگزاری کنند. از آقایان آزاد ابسواران، قاسم مرادی و مهدی باغبان و خانم الناز علائی نوین از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور که در جمع‌آوری نمونه و کمک در کارهای آزمایشگاهی مربوط به جوندگان نقش شایانی داشتند تشکر می‌نمایند. از سرکارخانم مهین فرهمند عضو هیات علمی بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران که در تهیه محیط کشت و مشاهده لام مستقیم ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌کنیم. بودجه این تحقیق از محل اعتبار پژوهشی انستیتو پاستور ایران و طرح مصوب شماره ۳۶۷ دکتر پرویز پرویزی تامین شده‌است.

منابع

1. Drummel Smith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome Mapping of the protozoan parasite Leishmania and Application to the study of Drug Targets and Resistanve Mechanisms. Mol Cell Proteomics 2003; 2: 146-155.

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

3. 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.

4. Evans D. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania. World Health Organization Geneva 1989; P: 1 – 157.

5. 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.

6. 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.

7. Schönian G, ElFari M, Lewin S, Schweynoch C & Presber W. Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. Med and Microb Immun 2001; 190: 61-63.

8. WHO TDR strategic Direction for Research Leishmaniasis. 2002.available at: www.who.int/tdr.

9. 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.

10. Seyedi-Rashti M, & Nadim A.Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Iran B.khorassan area part Ithe reservoirs. Bull Soc Pathol Exot. 1967 ; 60: 510-518.

11. Nadim A, & Faghih M. The epidemiliogy 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.

12. Yaghoobi-Ershaadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. Leishmania major MON-26 isolted from naturally infected Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) in Isfahan Province Iran. Acta Trop 1995 ; 59: 279-282.

13. Yaghobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebali M. Meriones libycus and Rhombomy opimus (Rodentia:Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniass in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 503-504.

14. 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.

15. Seyedi-Rashti M, & Nadim A. Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Iran B.khorassan area part I the reservoirs. Bull Soc Pathol Exot. 1967;60:510-518.

16. Ansari N, & Faghih M. Leishmaniose cutanee a L.tropica chez Rhombomys opimus . Ann parasit Hum Comp 1953 ; 28:241-246.

17. Javadian E, Mesgali A. Studies on cutaneous leishmaniasis in Khuzestan Iran Part I The leptomonad infection of sandflies. Bull Soc Pathol Exot 1974; 67: 513-516.

18. Nadim A, Mesghali A, & Javadian E.Cutaneous Leishmaniasis in southern Iran .Co11oques intenationux du C.N.R.S 1974; 239: 216.

19. Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran The Reservoir II The human disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 61: 534-542.

20. Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Med Iran 1971; 14: 99-106.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. Ansari N, & Faghih M. Leishmaniose cutanee a L.tropica chez Rhombomys opimus . Ann parasit Hum Comp 1953 ; 28:241-246.

25. Nadim A, Seyedi-Rashti MA, Mesgali A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara Iran. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1968; 71: 238-239.

26. Mohebali M. et al. Rodents another group of animal reservoir hosts of visceralLeishmaniasis in Meshkin-Shahr district the Islamic Republic of Iran . E Med Hlth J 1991; 4: 376-8.

27. 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 103: 1273- 1278.

Leishmania Infections in Rodents, Reservoir Hosts of Zoonotic Cutaneous Leismaniasis in Turkemen Sahara, Gonbad, Golastan Province

*Parvizi P.(Ph D)[1] -Hedayati M.(MSc)[1,2]

***Corresponding Address:** Molecular Systematics Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

E-mail: parp@pasteur.ac.ir

Received: 26/Aug/2009 Accepted: 7/Jul/2009

Abstract

Introduction: Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) is a tropical diseases caused by *Leishmania major*, which sandflies are vectors and rodents are reservoirs host. Turkmen Sahara after Isfahan, is the most important endemic disease focus in Iran.

Objective: Determination of *Lė shmania* Infections in Rodents, Reservoir Hosts of Zoonotic Cutaneous Leismaniasis in Turkemen Sahara, Gonbad, Golastan Province.

Materials and Methods: Rodents were captured by live-capture tarps. Cucumber and sometimes date were used for bating. A part of rodents ears was used to have serousite. Serosite transferred into NNN media, a part of rodents ears was used for sliding and staining for amastigote detection and other parts were used for inoculation to susceptible animal (Balb/c) in suspension form and biopsy was used.

Results: 40 rodents were captured, 27 were *Rhombomis opimus*, 12 were *Meriones libycus* and one was *Meriones* persicus. Of 40 rodents captured, 5 were positive in routine laboratory methods which 3 positive were *M. libycus*, one was *R. opimus* and one was *M. persicus*

Conclusion: Besides these new findings in *R. opimus* as well as in *M. libycus* and *M. persicus*. These two rodents should be considered as reservoirs of ZCL in region.

Key words: *Leishmania, major, Rhombomis opimus, Meriones libycus, Meriones persicus*, Golastan province

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 72, Pages:30-38

1. Molecular Systematic Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN

2. Department of Microbiology, Lahijan Islamic Azad University, Lahijan, IRAN