

اپیدمیولوژی مولکولی تریپانوزوما در تک سمی های ایران

• محمدرضا محزونیه

دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد

• حسین طهماسبی (نویسنده مسئول)

دانشجوی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیماری های مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد

• جاسم امیری ده چشمه و • هادی منجی

دانشجویان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۹۱

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱

Email: h.tahmasby@yahoo.com

چکیده

تریپانوزوم ها خون میزبانان مهره دار را آلوده و تب، ضعف و رخوت ایجاد می کنند که به کاهش وزن و آنمی و اگر بیماری درمان نشود در بعضی از حیوانات به مرگ منجر می شود و می توانند زیان های جدی اقتصادی ایجاد نمایند. با توجه به اهمیت آنچه ذکر گردید، مطالعه ای حاضر جهت ردیابی تریپانوزوم در تک سمیانی که از نظر ظاهری سالم بودند انجام شد. تعداد ۱۱۶ نمونه خون از استان های لرستان، همدان، گیلان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان و فارس جمع آوری گردید و به روش PCR مورد آزمون قرار گرفتند. هیچ نمونه ای آلوده به تریپانوزوم یافت نشد. نتیجه ای حاضر می تواند بیانگر این مسئله باشد که خوشبختانه عفونت با تریپانوزوم در ایران وجود ندارد یا از شیوع بسیار پایینی برخوردار است. جهت پیشگیری از بیماری پیشنهاد می شود از ورود تک سمیان مشکوک به بیماری به کشور ممانعت به عمل آید و تک سمیان وارداتی نیز که از نظر ظاهری سالم هستند به وسیله ای تست های سرولوژی و مولکولی مورد آزمایش قرار گیرند.

کلمات کلیدی: تریپانوزوم، آنمی، زیان های اقتصادی، تک سمی، PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 99 pp: 20-24

Molecular epidemiology of trypanosoma in equids in Iran

By: Mahzounieh, M. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, Tahmasby, H. Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author; Tel: +989137325071), Amiri, J. Dehcheshmeh and Monji, H. Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Received: March 2012

Accepted: July 2012

Trypanosomes infect the blood of the vertebrate host, causing fever, weakness, and lethargy, which lead to weight loss and anemia; in some animals the disease is fatal unless treated and causes serious economic losses. Considering the importance of what mentioned present study was conducted to detection of Trypanosoma in healthy equids. 116 blood samples collected from Lorestan, Hamedan, Chaharmahal va Bakhtiari, Guilan, Isfahan and Fars provinces and were tested by polymerase chain reaction (PCR). Trypanosoma was not found in any samples. Fortunately, this may suggest that the disease is not prevalent or prevalence of the disease is very low in Iran. It is suggested to prevent the disease by preventing equids suspected of carrying the disease from entering the country and imported healthy equids should be tested by serological and molecular tests.

Key words: Trypanosoma, Anemia, Economic losses, Equid, PCR

مقدمه

شده است در حال حاضر بر معدوم کردن حیوانات سرم مثبت استوار است. مسئله عدم درمان یا وجود واکسن خصوصاً در کشورهای در حال توسعه که از اسب سانان برای کشاورزی و حمل و نقل استفاده می شود از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۹).

در خاورمیانه مطالعات اندکی در زمینه بررسی وضعیت آلودگی تک سمیان به تریپانوزوم صورت گرفته است و وضعیت شیوع آن هنوز تا حد زیادی به صورت مجهول باقی مانده است (۴). در ایران گزارشاتی از آلودگی تک سمیان به تریپانوزوم وجود دارد (۱، ۲، ۳). در اردن (۴) و اسرائیل (۷) نیز گزارشاتی از اپیدمیولوژی آلودگی به تریپانوزوم در تک سمیان منتشر شده است.

از آنجا که در سال های اخیر مطالعه ای در مورد بررسی اپیدمیولوژی تریپانوزوم در تک سمیان در ایران انجام نشده، مطالعه حاضر با هدف ردیابی جنس تریپانوزوم در تک سمیانی که از نظر ظاهری سالم بودند در مناطق غربی، شمالی و مرکزی ایران به روش PCR صورت گرفت.

مواد و روش ها

کنترل مثبت از کلکسیون میکروب های گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه گردید. ۱۱۶ نمونه ی خون از تک سمیان مناطق مختلف لرستان، همدان، گیلان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان و فارس اخذ شد (جدول ۱) و جهت استخراج DNA از کیت High Pure Nucleic Acid (محصول شرکت Roche، ساخت آلمان) استفاده گردید و پس از استخراج DNA، نمونه ها جهت ردیابی جنس تریپانوزوم با روش PCR مورد آزمون قرار گرفتند برای این کار از پرایمرهای توصیف شده توسط Geysen و همکاران (ساخت سیناژن، ایران)،

بسیاری از انگل های تک یاخته ای خون، نظیر تریپانوزوم می توانند تک سمیان را آلوده نمایند و موجب خیز، پرخونی و خونریزی های نقطه ای در ناحیه ی ملتحمه ی چشم شوند (۸). تب دوره ای یکی از علائم این بیماری است و گاهی اوقات نیز وضعیت حیوان چنان حاد است که تب آشکار نمی شود (۱۹). شروع کم خونی در ارتباط نزدیک با وجود انگل در خون است (۱۵).

جنس تریپانوزوم بزرگ و شامل چندین گونه است و حیوانات وحشی و اهلی به خصوص حیوانات سم دار و همچنین انسان را آلوده می کند. تریپانوزوم های آفریقایی مثل *T. rhodesiense*، *T. gambiense*، *T. brucei*، *T. congolense*، *T. vivax* و *T. suis* همگی از طریق پشه های تسه تسه (گونه های *Glossina*) منتقل می شوند. گونه های ایجاد کننده ی تریپانوزومیازیس آفریقایی انسانی (بیماری خواب)، می توانند حیوانات وحشی را نیز آلوده می کنند و امکان انتقال از این حیوانات به انسان (بیماری مشترک) وجود دارد. اما تریپانوزوم های اسب (*T. equiperdum*) و شتر (*T. evansi*) به وسیله پشه های تسه تسه منتقل نمی شوند ولی از طریق تماس مستقیم با خون از طریق آمیزش (اسب) یا از طریق حشرات گزنده مثل پشه های اسبی (*tabanid*) منتقل می شوند.

T. equiperdum به طور اختصاصی باعث ایجاد بیماری دورین در اسب ها و *T. evansi* باعث ایجاد بیماری سورا به خصوص در چهارپایان و همچنین در پستانداران دیگر مثل انسان می شود (۱۶، ۲۰). به علت پایداری و دیرپا بودن این بیماری، ساخت واکسن برای آن بسیار مشکل شده است. همچنین بسیاری از حیوانات که درمان می شوند بیماری در آن ها عود می کند (۱۳). پروتکلی که توسط OIE برای این بیماری مطرح

که به صورت مزمن آلوده اند به علت خطا در یافتن انگل ها در بافت ها و رخداد زودگذر در جریان خون مشکل است (۵، ۶، ۱۴). اگرچه علائم در مراحل پیشرفته بیماری ممکن است پاتوگنومونیک باشد اما خصوصاً در مراحل ابتدایی یا کمون معمولاً با اطمینان قابل شناسایی نیستند. آزمایش PCR به عنوان یک روش دقیق و حساس در تشخیص عفونت با تریپانوزوم به کار گرفته شده است (۱۱).

در ایران گزارشاتی در مورد بررسی اسب سانانی که از نظر ظاهری مشکوک به آلودگی با تریپانوزوم بودند وجود دارد. به عنوان مثال در سال ۱۹۳۱ برای اولین بار یک دامپزشک فرانسوی که در ارتش خدمت می کرد علائمی شبیه به بیماری سورا را در اسب های خوزستان و لرستان مشاهده کرد (۲). وی گزارش کرد که ۷۱ اسب از ۸۱ اسب داران دزفول تلف شدند. در این گزارش تعیین گونه صورت نگرفت اما وی معتقد بود که عامل بیماری تشابه زیادی به *T. evansi* دارد.

قبل از انقلاب، دکتر رفیعی در کتاب خود در مورد *T. equiperdum* چنین قید کرده است که در اطراف کرمانشاه، لرستان و جنوب ایران مشاهدات دامپزشکان وجود *T. equiperdum* را تایید کرده است (۲). علائمی شبیه به بیماری سورا در سال ۱۳۴۰ در قاطرهای دزفول و در سال ۱۳۷۲ در اسب های ناحیه خرامه شیراز مشاهده و در موسسه رازی تشخیص داده شد و مورد تایید واقع گردید (۳). همچنین گزارشی موردی از تریپانوزومیازیس (۱۳۷۴) همراه با سقط جنین در یک مادبان آبستن ۸ ساله در شیراز گزارش گردیده است (۱).

۸ST nF۲ (CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA) و ۱۸ST nR۳ (TGC GCGACCAATAATTGCAATAC) استفاده گردید (۱۲). واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده به ترتیب واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل از قرار ۹۴ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (ساخت سیناژن، ایران) الکتروفورز (ساخت پایپژوهش پارس، ایران) گردیدند. برای نمونه های کنترل مثبت و منفی نیز به همین ترتیب عمل شد.

نتایج

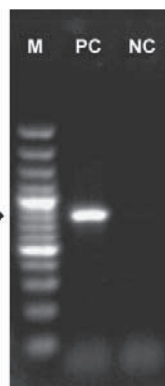
در این مطالعه در میان نمونه های ارزیابی شده هیچ نمونه مثبتی به دست نیامد.

بحث

تشخیص های انگل شناسی بیماری دورین در اسب ها یا الاغ هایی

جدول ۱- تعداد و نوع دام های نمونه گیری شده از مناطق مختلف

منطقه نمونه گیری	لرستان	همدان	چهارمحال و بختیاری	گیلان	اصفهان	فارس	مجموع
اسب	۱۴	۵	۳	۲۰	۱۲	۴	۵۸
قاطر	۵	۱۲	-	-	-	-	۱۷
الاغ	۱۳	۳	۲۵	-	-	-	۴۱
مجموع	۳۲	۲۰	۲۸	۲۰	۱۲	۴	۱۱۶



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز کنترل مثبت تریپانوزوم، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت تریپانوزوم.

مورد تریپانوزومیازیس (*T. evansi*) در اسب همراه با سقط جنین. مجله علمی دانشکده دامپزشکی اهواز. ۲، ۶۹-۷۷.

۲- رفیعی، ع. (۱۳۵۷) تک یاخته شناسی دامپزشکی و مقایسه ای. وزارت علوم و آموزش عالی.

۳- هاشمی فشارکی، ر.، اسماعیل نیا، ک.، حبیبی، غ.، سرکارزاده، پ. (۱۳۷۵) خلاصه مقالات اولین کنگره بهداشت و بیماری های اسب. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ۲۲-۲۴ آبان ماه، ۶۰-۶۱.

4- Abo-Shehada, M.N., Anshassi, H., Mustafa, G., Amr, Z. (1999) Prevalence of surra among camels and horses in Jordan, *Preventive Veterinary Medicine*. 38, 289-293.

5- Alemu, T., Luckins, A.G., Phipps, L.P., Reid, S.W.J., Holmes, P.H. (1997) The use of enzyme linked immunosorbent assays to investigate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Ethiopian horses. *Veterinary Parasitology*. 71, 239-250.

6- Barrowman, P.R. (1976) Observations on the transmission, immunology, clinical signs and chemotherapy of dourine (*Trypanosoma equiperdum* infection) in horses, with special reference to cerebro-spinal fluid. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 43 (2), 55-66.

7- Berlin, D., Nasereddin, A., Azmi, K., Ereqat, S., Abdeen, Z., Baneth, G. (2010) Longitudinal study of an outbreak of *Trypanosoma evansi* infection in equids and dromedary camels in Israel, *Veterinary Parasitology*. 174, 317-322.

8- Bradford, P.S. (1990) *Large animal Internal Medicine*. The C. V. Mosby Company, St. Louos, 1247.

9- Brun, R., Hecker, H., Lun, A.R. (1998) *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review), *Veterinary Parasitology*. 79, 95-107.

10- Clausen, P.H., Chuluun, S., Sodnomdarjaa, R., Greiner, M., Noeckler, K., Staak, C., Zessin, K.H., Schein, E. (2003) A field study to estimate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Mongolian horses, *Veterinary Parasitology*. 115, 9-18.

11- Gari, F.R., Ashenafi, H., Tola, A., Goddeeris, B.M., Claes, F. (2010) Comparative diagnosis of parasitological, serological, and molecular tests in dourine-suspected horses, *Tropical Animal Health and Production*. 42(8), 1649-54

12- Geysen, D., Delespau, V., Geerts, S. (2003) PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle, *Veterinary Parasitology*. 2, 110(3-4), 171-80.

13- Hagos, A., Goddeeris, B.M., Yilka, K., Alemu, T., Fikru, R., Yacob, H.T., Feseha, G., Claes, F. (2010) Efficacy of Cymerlarsan and Diminisan against *Trypanosoma equiperdum* infections in mice and horses, *Veterinary Parasitology*. 171, 200-206.

در مطالعات خارجی شیوع تریپانوزوم در تک سمیان مناطق مختلف از صفر (۴) تا ۹۱ (۱۸) درصد متفاوت بوده است.

طی مطالعه ای که در اسب های مغولی در سال ۲۰۰۳ به روش ELISA صورت گرفت شیوع *T. equiperdum* ۶/۷ درصد گزارش گردید (۱۰). در مطالعه ی Mesele و Leta در سال ۲۰۱۰ در اتیوپی آلودگی به تریپانوزوم در ۶/۲۷ درصد الاغ ها اعلام شد (۱۷). در اردن میزان آلودگی به *T. evansi* در شتر ۳۰/۵ درصد و در اسب ۳۳/۳ درصد گزارش گردید (۴). در مطالعه ی مقایسه ای تست های مختلف تشخیصی تریپانوزوم در سال ۲۰۱۰ در اتیوپی در اسب های مشکوک به Dourine توسط آزمون های Woo Test، Card و Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) به ترتیب ۴/۶، ۲۷/۶ و ۴۷/۶ درصد موارد مثبت گزارش شدند (۱۱). در یک بررسی در اسرائیل، با ارزیابی نمونه های اخذ شده از اسب، الاغ و شتر مشخص گردید که ۸۰ درصد شترها (۸ از ۱۰)، ۴۳ درصد از اسب ها (۳ از ۷) و ۴۶ درصد از الاغ ها (۶ از ۱۳) به *T. evansi* آلوده بوده اند (۷). در سال ۲۰۰۸ در گامبیا با مطالعه بر روی ۲۴۱ اسب و الاغ نشان داده شد که روی هم رفته شیوع تریپانوزوم در حیوانات ذکر شده ۹۱ درصد می باشد (۱۸).

مشابه با مطالعه صورت گرفته توسط Abo-Shehada و همکاران در اردن که در نمونه های اخذ شده از الاغ هیچ نمونه ی آلوده به *T. evansi* یافت نگردید (۴)، این مطالعه نیز عدم وجود آلودگی به تریپانوزوم را تک سمیان مورد بررسی نشان می دهد.

نتیجه گیری

نتیجه حاضر خوشبختانه می تواند بیانگر این مسئله باشد که عفونت با تریپانوزوم در نمونه های متعلق به مناطق مورد بررسی وجود ندارد و یا از شیوع بسیار پایینی برخوردار است که این مورد به ویژه در تجارت و نقل و انتقال دام ها نکته مثبتی برای پرورش صنعت اسب داری کشور محسوب می شود. با توجه به اینکه هرگاه بیماری در منطقه ای وجود نداشته باشد باید از ورود بیماری به آن منطقه پیشگیری نمود (۲)، اعمالی از قبیل ممانعت از ورود دام های مشکوک به بیماری، استفاده از سیلیمی های سالم برای تخم کشی، نظارت بر سیلیمی ها و مادیان های مشکوک به وسیله ی آزمایش های سرولوژیکی و مولکولی، اخته کردن و یا از بین بردن حیوانات بیمار با ارزش اقتصادی پایین و درمان مبتلایان با ارزش اقتصادی بالا توصیه می گردد (۲).

قدردانی و تشکر

نویسندگان مراتب تشکر خود را از سرکار خانم فاطمه یکنه کارشناس آزمایشگاه گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد و آقایان احمد سبزیان و محمد فرج واجاری دانش آموزان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و کلیه عزیزانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند اعلام می دارند.

منابع مورد استفاده

۱- بدیعی، خ.، رحیم احمدی، م.، نظیفی حبیب آبادی، س. (۱۳۷۴) گزارش یک

- 14- Hoare, C.A., (1972) *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 593–604.
- 15- Losos, G., Chouinard, A. (1979) *Pathogenicity of Trypanosomes, Proceeding of a workshop held at Nairobi, Kenya, 20-23 November 1978*. IDRC Publicatin. 230-136
- 16- Lun, Z.R., Fang, Y., Wang, C.J., Brun, R. (1993) Trypanosomiasis of domestic animals in China, *Parasitology Today*. 9,41–5.
- 17- Mesele, F., Leta, S. (2010) prevalence Rate of Tsetse Transmitted Donkey Trypanosomosis in Dale Wabera District, Western Ethiopia, *Global Veterinaria*. 5 (3), 180-183.
- 18- Pinchbeck, G.L., Morrison, L.J., Tait, A., Langford, J., Meehan, L., Jallow, S., Jallow, J., Jallow, A., Christley, R.M. (2008) Trypanosomosis in the Gambia: Prevalence in working horses and donkeys detected by whole genome amplification and PCR, and evidence for interactions between Trypanosome species, *BMC VC Veterinary Research*. 20(4),7.
- 19- Radostits, O.M., Blood, D.C. (1994) *Veterinary Medicine*, Bailliere Tindal, London. 1218-1220
- 20- WHO. (2005) A new form of human trypanosomiasis in India, *Weekly Epidemiological Record*. 80,62–63.

