مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۶۰- ۵۳

فرایند جداسازی دو ژن *wsp* و *16S rRNA* باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* در پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران

پرویز پرویزی [۱*]، فرزانه فردید [۲]، عارف امیرخانی [۳]

۱) آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی ، انستیتو پاستور ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
۳) بخش اپیدمیولوژی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: پرویز پرویزی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران- تهران، ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱ – ایران
تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۵- ۰۲۱ parp@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* از جمله باکتری‌های *ریکتزیایی* است. ژن این باکتری در حشرات به‌صورت مادرزادی به ارث می‌رسد و می‌تواند عامل ایجاد ناسازگاری‌های سیتوپلاسمی باشد. این باکتری به‌طور بالقوه می‌تواند در دستکاری‌های ژنتیکی جمعیت و کنترل ناقلین برخی بیماری‌ها مفید باشد. در این مطالعه *W. pipientis* با استفاده از روش PCR در پشه خاکی گونه *فلبوتوموس پاپاتاسی* ، ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران ، ردیابی و مشخص شد. برای این منظور از ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp* gene) استفاده گردید.

روش بررسی: برای تشخیص و ردیابی باکتری *W. pipientis* از ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp* gene) استفاده شد. با استفاده از روش PCR، از دو جفت پرایمر اختصاصی (wsp 691R/81F) و (16S 994R/99F) استفاده گردید. توالی‌های بدست آمده با نرم افزار Sequencher TM v.3.1 ویراستاری و مقایسه شدند . جهت مشخص کردن هاپلوتایپ‌های *W. pipientis* و آنالیز و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن از نرم افزار PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) استفاده شد.

یافته ها: از ۱۶۵ عدد پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی*، قطعه ژنی *wsp* در ۱۲۴ (۷۵/۲٪) و قطعه ژنی 16s rDNA در ۱۲۳ (۷۴/۵٪)، پشه خاکی تکثیر و تعیین توالی شد . برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

نتیجه گیری : استفاده از یک سویه ژنتیکی تعریف شده برای *W. pipientis* در استفاده از ترانسژن‌ها، امکان انتقال *Leishmania major* را توسط پشه خاکی، به منظور جلوگیری از انتشار آن، افزایش می‌دهد. سویه‌های ژنتیکی این باکتری می‌توانند فنوتیپ ناسازگاری سیتوپلاسمی را در جمعیت پشه خاکی *گونه فلبوتوموس پاپاتاسی* نشان دهند. با توجه به وجود آلودگی طبیعی *ولباکیا* در پشه خاکی‌ها و ناسازگاری سیتوپلاسمی، امکان استفاده از *ولباکیا* به‌عنوان ترانسژن ژن‌های هدف در بین جمعیت پشه خاکی‌ها مورد نظر، می توان جمعیت ناقلین را تحت کنترل در آورد و با گسترش بیماری لیشمانیوز مقابله کرد.

کلید واژه‌ها: *Wolbachia pipientis*، *فلبوتوموس پاپاتاسی*، ژن RNAی ریبوزومی(16 s rRNA)، ژن پروتئین سطحی (*wsp* gene) ، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه:

باکتری داخل سلولی ولباکیا اولین بار درون بافت‌های تولید مثل پشه *Culex pipiens* توسط Hertig & Wolbach در سال ۱۹۲۴ گزارش شد. و این ریکتزیا بعد از آن *Wolbachia pipientis* نام گرفت. این دسته از باکتری‌های گرم منفی، ریکتزیا هستند که از طریق سیتوپلاسم انتقال پیدا می‌کنند و باعث ایجاد عفونت‌های داخل سلولی توارثی در بسیاری از میزبانان بی مهره می‌شوند. این باکتری‌ها در بافت‌های تولید مثل (تخمدان و بیضه‌ها) طیف وسیعی از بندپایان یافت می‌شوند(۱). این باکتری‌ها باعث ایجاد شکل‌های تغییرات تولید مثلی در میزبانانشان می‌شوند. تغییرات شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی (cytoplasmic incompatibility=CI) بین سویه‌ها و گونه‌های مرتبط، القاء پارتنوژنز و مؤنث‌سازی ژنتیکی نرها، (شکل۱) است. این حالت زمانی رخ می‌دهد که نرهای آلوده با ماده‌های سالم جفت‌گیری کنند، یا ماده‌ها سویه متفاوتی از *W. pipientis* را حمل نمایند. *W. pipientis* به‌وسیله این مکانیسم می‌تواند بین جمعیت‌های میزبان، بدون نیاز به انتقال عرضی ، انتشار یابد. در چنین حالتی، ممکن است از این باکتری‌ها به منظور حمل ترانس‌ژن‌ها بین جمعیت‌های حشراتی که اهمیت پزشکی دارند، به منظور ایجاد تداخل وهمچنین کنترل انتقال انگل، استفاده شود (۳،۲).

این توصیفات و تغییرات تولید مثلی میزبان باعث بهره‌مندی باکتری از مزایای انتخابی می‌شود. ولباکیاها بسیار وسیع الطیف هستند (۳،۱). طی مطالعات اخیر این باکتری در بیش از ۲۰٪ گونه‌های حشرات، از جمله در پشه خاکی‌های ناقل بیماری لیشمانیوز، به‌طور طبیعی پیدا شده است (۵،۴).

پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی ناقل لیشمانیا میجر (*Leishmania major*) ، عامل لیشمانیوز جلدی روستائی در انسان است. این پشه خاکی چندین آربوویروس را هم در نواحی خشک آفریقای شمالی و آسیای غربی از مدیترانه غربی تا بنگلادش انتقال می‌دهد (۷،۶). محققین باکتری داخل سلولی شبه ریکتزیایی *W. Pipientis* را در پشه خاکی‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و با تکثیر قطعات ژن RNAی ریبوزومی 16s (16s rDNA) و نیز ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp*)، شناسایی کرده‌اند (۱۰-۷).

مواد و روش‌ها:

پشه خاکی‌ها از مناطق تحت مطالعه با استفاده از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و آسپیراتور صید و جمع‌آوری شدند (شکل ۲ نقشه مناطق مورد مطالعه) (۷). پشه خاکی‌ها به‌وسیله دود سیگار و یا قرار دادن در فریزر کشته شده و سپس در الکل ۹۶٪ قرار گرفتند. نمونه‌ها جهت آزمایش‌های مولکولی ابتدا در یخچال ۴+ درجه و سپس درفریزر۲۰- درجه نگهداری شدند. پشه خاکی‌ها از داخل لوله‌ها به داخل یخ در ظروف پتری شیشه‌ای، حاوی ۱٪ مایع ظرفشوئی در آب استریل، منتقل شده و به مدت دو دقیقه در این حالت نگه‌داری می‌شدند. سپس با سمپلر مایع ظرفشوئی ۱٪ در آب استریل را خالی نموده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدت پنج دقیقه در آب استریل برای مرحله دوم شستشو می‌شدند. هر پشه خاکی روی یک قطره 1 x TE در روی الام تمیز زیر لوپ بررسی می‌شد. سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا و مابقی جهت جدا کردن DNA تشریح می‌شدند (۱۱،۷، ۱۲).

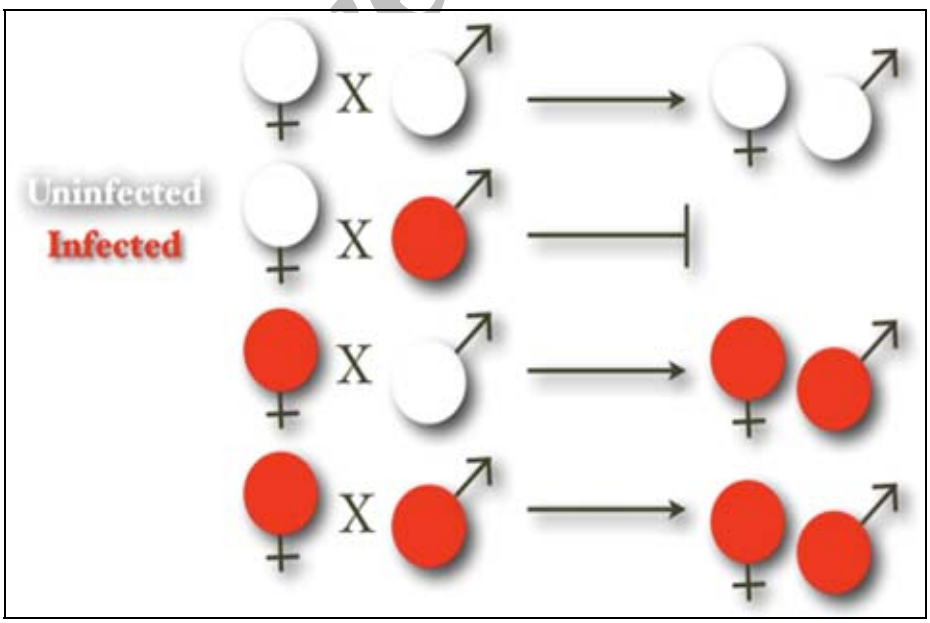
extraction (جداسازی و خالص‌سازی DNA) پشه خاکی‌ها با استفاده از روش Ready و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت (۱۳).

میکروتیوب‌های حاوی بدن پشه خاکی (به غیر از سر و دو بند انتهایی شکم) داخل فریزر $-20°C$ به دمای آزمایشگاه منتقل می‌شد. این عمل به منظور ایجاد شوک فیزیکی جهت بهتر له شدن بدن پشه خاکی ۲ بار تکرار می‌شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول Grinding Mix داخل میکروتیوب ریخته و با نوک سرسمپلر بدن پشه خاکی کاملاً له شد. سپس ۵۰ میکرولیتر مابقی از محلول G.M (در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر) در میکروتیوب ریخته می‌شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول SDS mix به هر میکروتیوب اضافه می‌گردید. تمامی میکروتیوب‌ها ورتکس می‌شد و به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ می‌گردید short spin) . تمامی میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده می‌شد. به منظور کاهش دمای نمونه‌ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند و بعد ۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (KOAC) ۸ مولار به آنها اضافه می‌شد. مجدداً میکروتیوب‌ها به‌ترتیب ورتکس و سانتریفوژ کوتاه می‌شدند، سپس به‌مدت ۱۲۰-۴۵

Archive of SID

www.SID.ir

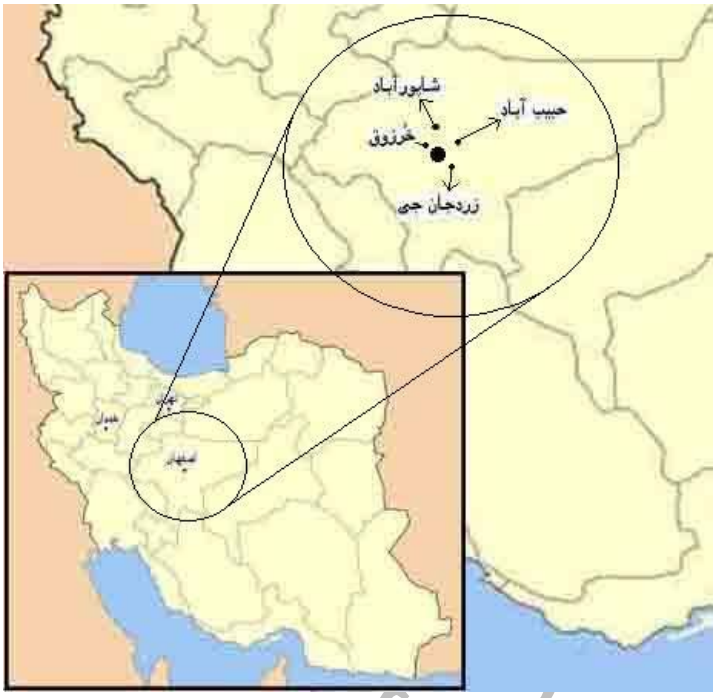
دقیقه داخل یخ خرد شده قرار می‌گرفتند. نمونه‌ها با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. محلول روئی با استفاده از سمپلر جدا می‌شد و به میکروتیوب‌های جدید و کدگذاری شده، منتقل می‌گریدند. ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ سرد (درون فریزر نگهداری می‌شود) به میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. نمونه‌ها در تمام طول شب (over night) در فریزر $-20°C$ نگهداری می‌شدند. صبح روز بعد نمونه‌ها از فریزر خارج می‌شد تا از سرمای آن کاسته شود. میکروتیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. محلول رویی میکروتیوب‌ها با کج کردن، دور ریخته می‌شد و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب DNA موجود در ته میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. میکروتیوب‌ها را تکان مختصری داده و با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. مجدداً الکل رویی موجود در میکروتیوب‌ها با کج کردن خارج می‌شدند. سپس میکروتیوب‌ها را به‌صورت وارونه بر روی کاغذ خشک کن یا دستمال کاغذی کشیده می‌شد تا هیچگونه الکلی در آنها باقی نماند. این مراحل ۳ بار تکرار می‌شد. در تمام میکروتیوب‌ها باز و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفت تا داخل آنها خشک شود و الکل موجود در آنها کاملا تبخیر گردد. به منظور جلوگیری از قرارگرفتن گرد و غبار درون میکروتیوب‌ها یک دستمال کاغذی بر روی آنها قرار داده می‌شد. پس از کسب اطمینان از تبخیر شدن کامل الکل، ۱۵ میکرولیتر 1X TE buffer به تمام آنها اضافه می‌شد. به تک تک میکروتیوب‌ها تکان مختصری داده و سپس سانتریفوژ کوتاه می‌شدند (۴ بار این عمل تکرار می‌شد). میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفت و بعد برای استفاده کوتاه مدت، نمونه‌ها در یخچال $4°C$ و برای استفاده بلند مدت در فریزر $-20°C$ نگهداری می شدند.



شکل ۱: ناسازگاری سیتوپلاسمی القائی وُلباکیا در بندپایان

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: مناطق مورد مطالعه پشه خاکی‌های جمع‌آوری شده جهت تعیین آلودگی ولباکیا

برای تعیین وجود باکتری وولباکیا در پشه خاکی‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی *wsp* به‌نام *81F* (forward) با نوکلئوئیدهای (5′TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 3′) و نیز پرایمر *691R* (reverse) با نوکلئوئیدهای (5′ AAAAATTAAACGCTACTCCA 3′)یک قطعه که حدود ۵۵۰ (base pair)، بدون احتساب پرایمرها می‌باشد، تکثیر یافتند. برای ژن RNAی ریبوزومی (16 s rDNA)، از پرایمری به‌نام 99F (forward) با نوکلئوئیدهای (5′TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT 3′) و نیز پرایمر 994R (reverse) با نوکلئوئیدهای (5′GAATAGGTATGATTTTCATGT 3′) استفاده شد (۹،۵). جهت اطمینان از کارکرد درست PCR از کنترل مثبت (نمونه پشه خاکی‌هایی که توسط پرویزی و همکاران در بررسی‌ها و مطالعات قبلی در Natural History Museum انگلستان انجام گرفته است. این نمونه‌ها دارای میزان بالای ژن *wsp* هستند که به‌عنوان کنترل مثبت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند) و اطمینان از عدم آلودگی PCR از کنترل منفی (آب مقطر) استفاده می‌شد. محصول PCR بدون کلون کردن و به‌طور مستقیم تعیین توالی گردید.

یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و با اسید آمینه با کیت BI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه (373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها و تنظیم توالی و مطابقت کردن نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار SequencherTm 3.1.1 software (Gene Codes Corporation). استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic Analysis Using Parsimony و یا PAUP× استفاده شد (۱۵).

یافته‌ها:

باکتری ولباکیا در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی و در جمعیت‌های متفاوت، از نظر زیستگاه طبیعی و مناطق مختلف ایران ، بررسی شد. با استفاده از فناوری‌های مولکولی ، این باکتری جدا شد (شکل ۲ مناطق مورد مطالعه). با استفاده از فناوری PCR ژن‌های 16s rDNA و ژن پروتئین سطحی ولباکیا (*wsp*) در پشه مذکور تکثیر یافت و آلودگی به *W. Pipientis* بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد در مناطق مورد مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

مشخص شد. آلودگی به ولباکیا هم در مناطق اندمیک بیماری لیشمانیوز در ۴ روستا در اصفهان و نیز مناطق غیر اندمیک بیماری در همدان و کرج یافت شد (جدول ۱). پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی که بر اساس تکثیر قطعه ژن *wsp* ولباکیا مثبت بود، با استفاده از پرایمرهای 16s rDNA، برای این ژن نیز مثبت بود. فقط یک پشه برای قطعه ژن 16s rDNA مثبت بود اما برای قطعه ژن *wsp* مثبت نبود.

یک نوع هاپلوتایپ در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی صید شده از ایران، مستقل از منشاء ژئوگرافی و از نظر زیستگاه طبیعی مناطق مختلف مورد مطالعه در ایران، تشخیص داده شد. همه‌ی ۱۲۴ قطعهٔ ژنی *wsp* تکثیر یافته از پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی مستقیماً تعیین توالی شدند و فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد. با تعیین توالی مستقیم همه ۱۲۳ توالی 16s rDNA تکثیر شده از *فلبوتوموس پاپاتاسی‌های* ایرانی، یک هاپلوتایپ منفرد با توجه به منشاء ژئوگرافیک و زیستگاه بدست آمد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژن). توالی‌های هر دو ژن نیز در بانک جهانی ژن به ثبت رسید و شماره دسترسی EU780684 در بانک جهانی ژن برای ژن پروتئین سطحی ولباکیا (*wsp*)، و شماره دسترسی EU780683 در این بانک برای ژن 16s rDNA ثبت گردید.

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی *W. pipientis* جدا شده با دو روش مولکولی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی صید شده به تفکیک مناطق مختلف ایران

نواحی مورد بررسی		تعداد موارد بررسی با روش *(wsp)PCR*	موارد مثبت *wsp*	درصد موارد مثبت *wsp*	کل موارد بررسی با روش *16s rDNA PCR*	موارد مثبت *16s rDNA*	درصد موارد مثبت *16s rDNA*
استان	منطقه						
اصفهان	شاپورآباد	۳۴	۲۷	۷۹/۴	۳۴	۲۷	۷۹/۴
اصفهان	حبیب آباد	۵۸	۴۱	۷۰/۷	۵۸	۴۰	۶۸/۲
اصفهان	خُرزوق	۳۲	۲۴	۷۵/۰	۳۲	۲۴	۷۵/۰
اصفهان	زردجان جی	۲۲	۱۵	۶۸/۲	۲۲	۱۵	۶۸/۲
همدان	همدان	۱۶	۱۴	۸۷/۵	۱۶	۱۴	۸۷/۵
تهران	کرج	۳	۳	۱۰۰/۰	۳	۳	۱۰۰/۰
	جمع	۱۶۵	۱۲۴	۷۵/۲	۱۶۵	۱۲۳	۷۴/۵

بحث:

قطعات ژنی wsp و 16s rDNA به ترتیب از ۷۵/۲درصد و ۷۴/۵ درصد از پشه خاکی‌های فلبوتوموس پاپاتاسی تکثیر و تعیین توالی شدند. برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

هاپلوتایپ ژن *wsp* 546 bp ی (بدون احتساب پرایمرها) (با شماره دسترسی EU7800683 در بانک ژن) که غیر قابل تشخیص از گروه A سویه *W. pipientis* (*wPap*) است، پیش از این از فلبوتوموس پاپاتاسی از کرانه باختری رود اردن (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237883) و هند (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237882)، بدست آمده است. این نتیجه پس از مقایسه با همه‌ی پشه خاکی‌های موجود از اسپانیا و ایران و همچنین مجموعه‌ای از دو تا سه دسته از پشه خاکی‌هایی که توالی شماره دسترسی در بانک ژن AF237883 را داده

www.SID.ir

بودند بدست آمد (۷،۶و۹). سایر توالی ها از *فلبوتوموس پاپاتاسی*هایی جدا شد که در کلونی‌های آزمایشگاهی پرورش داده شده بودند. با استفاده از پرایمرهای ژن *wsp* مشابه، Cui و همکارانش قطعه ای حدوداً 600 bpی را از فلبوتوموس پاپاتاسی‌های جمع‌آوری شده از کرانه باختری رود اردن، شمال صحرای سینا در مصر، و عربستان صعودی تکثیر کردند. البته آن‌ها هیچ توالی جدیدی را گزارش نکردند. در اصل این طور گزارش شد که هاپلوتایپ *wPap* یک باز مبهم (C/T) در موقعیت نوکلئوتید ۱۰۲ دارد(شماره دسترسی در بانک ژنیAF020082)(۴). اما، یک باز C در این موقعیت در کار حاضر و همچنین در تمام بررسی‌های دیگر یافت شد. توالی 16s rDNA هاپلوتایپ ما با 854 bp (بدون احتساب پرایمرها) (شماره دسترسی EU780683 در بانک ژنی) به واسطه چهار جهش نقطه‌ای و وقوع سه جهش حذف- جایگزینی از آن چه که قبلاً توسط O'Neill و همکارانش یافت شده بود، متفاوت بود (۱۸،۳). توالی جدید با توالی‌های 16s rDNAی ولباکیا بدست آمده از سایر حشرات مقایسه شد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژنی). ارتباطات فیلوژنتیکی را می‌توان با استفاده از الگوریتم‌های قرابتی و نیز استفاده ازPAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) تائید کرد (۱۵). فیلوگرام بدست آمده توسط یک آنالیز، الحاق مجاور در دو توالی از فلبوتوموس پاپاتاسی را روی شاخه انتهایی، مشابه گروه A سویه های *W. pipientis*، جایگزین کرده است.

مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از 16s rDNA نشان داد که سویه‌های *W. pipientis* از میزبان‌های بسیار واگرا (دور از نظر قرابت ژنتیکی) از دسته مونوفیلتیک، مرتبط با دسته Ehrlichia در زیر شاخه α از Proteobacteria می باشد (۸،۵). ژن 16s rDNA توالی حفاظت شده‌ای است که نه تنها جایگزاری فیلوژنتیکی گونه‌های باکتریایی را مجاز می‌کند بلکه باعث افتراق فیلوژنتیکی *W. pipientis* به دو گروه A و B می‌شود (۳،۲). به تازگی به دلیل دسترسی سریع‌تر به ژن *wsp*، جهت بهبود افتراق فیلوژنتیک بین دسته گونه‌های *W. pipientis* استفاده شده است. ار این نظر به چهار گروه (A-D) و ۱۲ زیرگروه تقسیم شده است (۳، ۸ ،۱۶). گروه‌های A و B مشابه آن‌هایی هستند که به‌وسیله 16s rDNAی سویه‌های *W. pipientis* بدست آمده از حشرات، مایت‌ها و سخت پوستان شناسایی شده بود. در حالیکه گروه‌های C و D مربوط به سویه‌های بدست آمده از نماتودهای فیلاریال است. پیش از این، یک سویه ژنتیکی منفرد از *W. pipientis* با هدف قرار دادن ژن *wsp* در *فلبوتوموس پاپاتاسی*های وحشی ایران و اسپانیا شناسایی شد. اما این احتمال که اگر یک یا هر دو پرایمرهایPCR، هاپلوتایپ‌های اختصاصی را ابراز کنند، سایر سویه‌ها ممکن است از بین بروند، وجود داشت و باقی ماند (۱۷،۱۶). در موقعیت‌های مشابه، تکثیر 16s rDNA یا سایر قطعات ژنی گاهی اوقات امکان شناسایی آلودگی‌های دو گانه را ایجاد می‌کند (۳). بنابراین، ما در گزارش حاضر آلودگی‌های *W. pipientis* در پشه خاکی‌های وحشی فلبوتوموس پاپاتاسی را از طریق هدف‌گیری ژن 16s rDNA بعلاوهٔ ژن *wsp* جستجو کردیم. جمعیت‌های فلبوتوموس پاپاتاسی از ایران مجدداً بررسی شدند، که فقط یک هاپلوتایپ برای هر ژن بدست آمد. ما این طور استنباط کردیم و حدس می‌زنیم که قطعات 16s rDNA از منشاء باکتریایی مشابه هستند، مثل قطعات ژن *wsp* ، و بنابراین نتیجه گیری می‌شود که با وجود طیف بسیار وسیع آن، فقط یک سویه گروه A از *W. pipientis* در گونه‌های پشه خاکی یافت می‌شود. برای یک کلونی آزمایشگاهی فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، توالی متفاوتی از 16s rDNA توسط O'Neill و همکارانش گزارش شد (۳) و یک هاپلوتایپ متفاوت از ژن *wsp* نیز توسط Zhou و همکارانش گزارش شد (۸). این ممکن است یک سویه ثانویه ای از *W. pipientis* یافت شده در خاورمیانه را نشان دهد، اما توالی‌ها ممکن است حقیقی نباشند (مصنوعی باشند).به این دلیل که نه تنها از یک کلونی آزمایشگاهی فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده‌اند بلکه آن‌ها فقط یکبار تعیین توالی شده‌اند. هیچ تنوع ژنتیکی سویه *W. pipientis* در فلبوتوموس پاپاتاسی‌های وحشی یافت نشد حتی برای ژن *wsp* ، که اغلب پلی مورفیک است (۴). این با یافته‌های جمعیت پشه خاکی‌ها سازگار بوده و مغایر نمی‌باشد.

Cui و همکارانش آلودگی‌های ولباکیا را در سه دسته کلونی آزمایشگاهی فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، مصر و عربستان صعودی پیدا کردند. اما در یک کلونی جمع‌آوری شده از اردن یافت نشد (۴). Kassem و همکارانش دو کلونی فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از مصر را برای ولباکیا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که پشه‌های جمع‌آوری شده از شمال صحرای سینای مصر آلودگی ولباکیایی را در خود جای داده‌اند، در حالیکه پشه بدست آمده از اسکندریه (Alexandria) این آلودگی را نداشت (۱۰).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیـجه‌گیری شد که برخـی جمعیـت‌های این پشـه خاکی به‌طور جغرافیائی ایزوله شده‌اند.

البته وجود *W. pipientis* به‌طور اکید در ارتباط با اندمیک بودن ZCL (بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی) نیست. به این دلیل که این باکتری در جمعیت‌های فلبوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از نواحی غیر اندمیک ایران نیز یافت شده است (۷). آلودگی بالای فلبوتوموس پاپاتاسی به باکتری ولباکیا می‌تواند به دلیل خصوصیات فیزیولوزیک و اکولوزیک این پشه در توانایی حفظ و نگهداری این باکتری و انتقال به نسل‌های بعدی این پشه خاکی باشد. زیرا در گونه‌های دیگر پشه خاکی یا اصلا آلودگی باکتری ولباکیا دیده نشده و یا موارد بسیار کمتر بوده است. ما در پروژه تحقیقاتی اخیر این موارد را مشاهده نمودیم . همچنین علی رغم تحقیقات گسترده در سطح جهان تاکنون در پشه های آنوفل(ناقلین بیماری مالاریا)باکتری ولباکیا را نتوانسته‌اند بیابند. آلودگی بالای فلبوتوموس‌پاپاتاسی به باکتری‌ولباکیا در گزارشات محققین در دیگر نقاط جهان نیز دیده شده است (۹،۱۰).

نتیجه‌گیری:

با توجـه به هاپـلوتایپ میتوکنـدریایی، زیـست‌گـاه و منـشاء ژئوگرافیکی، مشخص شده که فلبوتوموس پاپاتاسی می‌تواند به *W. pipientis* آلوده نباشد. در غیر اینصورت با یک سویه وسیع الطیف معمول آلوده باشد. این امر به نوبه خود، احتمال استفاده از فقط یک سویه تعریف شدهٔ ژنتیکی *W. pipientis* را جهت حمل ژن (ترانسژن)هایی برای ایجاد تداخل در انتقال لیشمانیا در میان جمعیت های پشه خاکی، بالا می برد. برپایه تئوری کلی، این سویه تعریف شدهٔ ژنتیکی مجبور است فنوتیپ CI (ناسـازگاری سیتـوپلاسمی) را بـه منـظور انتـشار سـریع بیـن جمعیت‌های پشه خاکی وحشی، در فلبوتوموس پاپاتاسی‌ها نشان دهد. همچنین پشه‌ها همانطور که گفته شد مجبورند با نوع وحشـی سـویه *W. pipientis* آلـوده شـونـد اگر چه باید CI ناسازگاری سیتوپلاسمی نشان دهند.

می‌توان از ولباکیا به‌عنوان یک سیستم انتقال دهندهٔ ژن یا ترانسژن حشرات (پشه‌ها) استفاده کرد. بدین صورت که ژن‌های هدف را توسط علم مهندسی ژنتیک طراحی و سنتز نمود و سپس به داخل ژنوم ولباکیا منتقل کرد، و آن را به داخـل جمعیـت حـشره وارد کرد. این کار در جهت کنترل بیولوژیک و مبارزه با انواع انگل‌ها و ویروس‌های منتقله توسط بندپایان بسیار مفید و مـؤثر خواهـد بود. (۱۳، ۱۹).

تقدیر وتشکر:

نویسندگان مقاله از همکـاری صـمیمانه آقـای مهـدی باغبـان و همچنین از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی که در جمع آوری نمونه کمک شایانی نموده‌اند، تشکر می‌نمایند. بودجه ایـن تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتوپاستور ایران بـه طـرح مصوب ۳۶۶ دکتر پرویزی تامین گردیده است.

فهرست مراجع:

1. Rousset F, Solignac M. Evolution of single and double Wolbachia symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 6389-6393.
2. Braig HK, Zhou W, Dobson SL, O'neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2373-2378.
3. O' Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplamic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 2699-2702.
4. Cui L, Chang SH, Stickman D & Rowton E. Frequency of Wolbachia infection in laboratory and field sand fly Diptera Psychodidae populationsn. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; **15**: 571-572.
5. Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C, O'neill SL. Wolbachia infections of phlebotomine sand flies Diptera Psychodidae. *J Med Entomol* 2001; **38**: 237-241.
6. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; **95**: 239-243.
7. Parvizi P, Benlarbi M, Ready PD. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi* little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province Iran. *Med Vet Entomol* 2003; **17**: 351-362.
8. Zhou W, Rousset F, O'neill S. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains

Archive of SID
www.SID.ir

using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci* 1998; **265**: 509-515.
9. Benlarbi M, Ready PD. Host specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* Diptera Psychodidae and prospects for driving genes into these vectors of Leishmania. *Bull Entomol Res* 2003; **93**: 383-391.
10. Kassem HA , Hassan AN, Abdel Hamed I, Osman G, El Khalab EM, Madkour MA. Wolbachia infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies Diptera Psychodidae from Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; **97**: 639-644.
11. Parvizi P& Ready PD . Nested PCRs of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sanflies from Iranian Foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med & Int Health* 2008; **13**: 1159-1171.
12. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus Phlebotomus Diptera Psychodidae. *Bull Br Mus* 1982; **45**: 121-209.
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. Testa JM, Montoya Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD**.** Molecular identification of vectors of Leishmania in Colombia mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop* 2002; **84**, 205-218.
15. Swofford DL. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. version 40 Sinauer Associates Sunderland Massachusetts 2002.
16. Weeks AR , Reynolds KT, Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics what has and has not been demonstrated. *Trends Ecol Evol* 2002; **17**: 257-262.
17. Curtis CF, Sinkins SP. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parazitol* 1998**; 116**: S111-115.
18. Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M. Two novel strains of Wolbachia coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Mol Biol* 2002; **11**: 577-584.
19. Turelli M, Hoffmann AA. Microbe induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Mol Biol* 1999; **8** : 243-255.

Archive of SID

www.SID.ir