Archive of SID

مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۲۱ الی ۱۳۳

ردیابی مولکولی همزمان سه گونه انگل لیشمانیا در پشه خاکی‌های منطقه کلیبر، از مناطق اندمیک لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در شمال غربی ایران

دکتر پرویز پرویزی[1]، الناز علائی نوین [2]

[1] نویسنده مسئول: دانشیار حشره شناسی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، بخش انگل شناسی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، تهران، ایران

E-mail: parp@pasteur.ac.ir

[2] کارشناس، انستیتو پاستور ایران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، تهران، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: لیشمانیا اینفانتوم به عنوان عامل لیشمانیوز احشایی است. لیشمانیا اینفانتوم براساس تعداد معدود تایپ ایزوآنزیم از انسان‌ها و سگ‌ها در منطقه کلیبر با وفور بالا دیده شده ولی تاکنون درباره آلودگی لیشمانیایی پشه خاکی‌های ناقل بیماری گزارشی منتشر نشده است. لذا این مطالعه با هدف تعیین آلودگی پشه خاکی های ناقل بیماری در منطقه انجام شد.

روش کار: پشه خاکی‌ها با تله‌های چسبان و نورانی صید گردید. پس از تشریح پشه خاکی‌ها، سر و انتهای آن جهت شناسایی مورفولوژیکی گونه، و شکم و سینه آن جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. انگل لیشمانیا با استفاده از ژن ITS-rDNA ردیابی و پس از تعیین توالی شناسایی شد.

یافته‌ها: از مجموع ۱۴۶ عدد پشه خاکی که مورد آزمایش قرار گرفت ۹ مورد دارای آلودگی لیشمانیائی بوده است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، برای اولین بار سه گونه انگل لیشمانیا اینفانتوم، تروپیکا و میجر در پشه خاکی‌ها در منطقه کلیبر تشخیص داده شد. تنها یک مورد فلبوتوموس پرفیلیوی ناقل لیشمانیوز احشائی در این منطقه، آلوده به لیشمانیا اینفانتوم بود، که این یافته پس از تشخیص با Nested PCR و تعیین توالی ژن ITS-rDNA، انگل لیشمانیا مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه گیری: هرچند لیشمانیا تروپیکا و میجر بیش تر از لیشمانیا اینفانتوم در پشه خاکی‌ها در منطقه کلیبر یافت شدند ولی نمی توان نتیجه گرفت که این دو گونه لیشمانیا نیز از عوامل بیماری لیشمانیوز احشایی هستند زیرا یک عامل و یا ناقل بیماری دارای خصوصیات و ویژگی های متعدد می باشد که باید مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لیشمانیا اینفانتوم؛ لیشمانیا تروپیکا؛ لیشمانیا میجر؛ ITS-rDNA PCRT؛ فلبوتوموس پرفیلیوی؛ لیشمانیوز احشایی؛ کلیبر

دریافت: ۸۹/۷/۲۱ **پذیرش:** ۹۰/۳/۱۰

مقدمه

لیشمانیوز یکی از ۶ بیماری مهم گرمسیری می‌باشد که سه گونه از انگل لیشمانیا بعنوان عامل بیماری لیشمانیوز انسانی در ایران شناخته شده‌اند که به اشکال جلدی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی مخاطی ظاهر می‌شود که در ایران دو نوع جلدی و احشائی شایع است و نوع جلدی مخاطی تاکنون در ایران گزارش نشده است [۱].

عامل لیشمانیوز نوع احشایی، لیشمانیا اینفانتوم و ناقل آن پشه خاکی‌های گروه لاروسیوس و مخازن آن سگ و سگ سانان است. بسیاری از مناطق شمال غربی ایران تا مناطق شرقی ترکیه دارای شرایط آب

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Parvizi P, AlaeeNovin E. Simultaneous Detection of of Three *Leishmania* Species in Kaleybar, a Focus of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(2): 121-133. (Full text in Persian)

www.SID.ir

Archive of SID

و هوایی مدیترانه‌ای، و همانند بعضی از کشورهای حاشیه دریای مدیترانه دارای لیشمانیوز احشایی اندمیک هستند که عامل آن لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد [۲].

شیوع و فراوانی لیشمانیوز احشایی در انسان در دو منطقه شمال غربی ایران در مشکین شهر در استان اردبیل و در کلیبر در استان آذربایجان شرقی بالا است [۷-۳].

در هر دو این مناطق سیکل تیپیکال انتقال شبیه کشورهای حاشیه دریای مدیترانه است که در مناطق مذکور و روستاها و صحراهای مجاور، سگ مخزن لیشمانیا اینفانتوم گزارش شده است [۷،۶،٤].

در یک طرح تحقیقاتی در منطقه کلیبر از قلاده سگ آغشته به سم دلتا مترین، جهت کاهش میزان گزش پشه خاکی‌های ماده ناقل در مخازن بیماری استفاده شد [۶].

یافته‌های این تحقیقات موفقیت‌آمیز بود، زیرا پس از انجام این طرح در روستاهای تحت آزمایش در مقایسه با روستاهای تحت کنترل، موارد بیماری لیشمانیوز در انسان و نیز در سگ‌ها کاهش یافت.

شیوع بیماری بر اساس روش‌های معمول، تست‌های سرولوژیکی بود که برای گونه‌های لیشمانیا اختصاصی نیست، مثل (DAT) تست آگلوتیناسیون مستقیم [۷].

بر این اساس تعدادی از آلودگی‌های تشخیص داده شده احتمالاً لیشمانیا اینفانتوم نبوده است. آلودگی در پشه خاکی‌ها، اغلب با تعداد کم انگل لیشمانیا همراه می‌باشد و روش‌های مولکولی در تشخیص آلودگی معمولاً بیشتر از روش ایزوآنزیم که بعنوان روش استاندارد طلائی (gold standard) مطرح است با موفقیت همراه بوده است. محبعلی و همکاران در سال ۱۳۸۵با استفاده از روش‌های سرولوژی، مطالعاتی بر روی بیماری لیشمانیوز احشایی در ایران انجام دادند که بیشتر، تمرکز بر روی موارد انسانی و مخازن حیوانی بوده است و به ناقلین اشاره‌ای نداشته‌اند [۸].

عشاقی و همکاران انگل لیشمانیا اینفانتوم و دونوانی را از مناطق شمال شرقی ایران گزارش نمودند [۹].

راثی و همکاران در سال ۱۳۷۸ و نیز در سال ۱۳۸۸، مطالعاتی در مورد پراکندگی پشه خاکی‌های منطقه کلیبر و اهر انجام دادند ولی نسبت به آلودگی لیشمانیایی گزارشی منتشر نشده است [۱۱،۱۰].

تحقیقات و گزارشات و مقالات منتشر شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که لیشمانیا اینفانتوم تنها عامل بیماری لیشمانیوز احشایی انسانی نیست و این مورد می‌توانست در مورد منطقه کلیبر نیز صادق باشد لذا این پژوهش در منطقه انجام شد تا اولاً مشخص گردد که در پشه خاکی‌های منطقه فقط لیشمانیا اینفانتوم عامل بیماری لیشمانیوز احشایی در انسان است یا خیر؟ و آیا تنها این یک مورد لیشمانیا در منطقه وجود داشته و در سیکل انتقال بیماری نقش دارد و در ثانی وجود و نقش دیگر لیشمانیاها نیز در پشه خاکی‌ها و ناقلین لیشمانیوز بررسی گردد. بنا بر این ردیابی و تشخیص انواع انگل لیشمانیا در پشه خاکی‌ها در کلیبر و تایپ مولکولی انگل لیشمانیا به منظور تعیین و تائید قطعی نوع انگل لیشمانیا در پشه خاکی‌های ناقل بیماری لیشمانیوز احشایی از اهداف این تحقیق بوده است که با شناخت و تعیین ناقلین و عامل بیماری بهتر می‌توان برای کنترل بیماری برنامه‌ریزی کرد. برای تعیین یک پشه خاکی بعنوان ناقل، پیدا نمودن انگل بطور طبیعی، در پشه خاکی ماده ضروری است اما وجود انگل به تنهایی دلیل قطعی نیست که یک گونه از پشه خاکی ناقل بیماری لیشمانیوز بوده است. خیلی از آلودگی لیشمانیاها در پشه خاکی‌ها، موقت و زودگذر است [۱۲].

بسیاری از انگل‌ها در هنگام گوارش و هضم خون مکیده شده در پشه خاکی، دفع می‌شوند و سیکل آلودگی و فرم بیماری‌زائی انگل، در پشه خاکی کامل

www.SID.ir

Archive of SID

نمی‌شود. بدین منظور در مطالعه حاضر، صید، تشریح و انجام PCR پشه خاکی‌های ماده در انتهای فصول فعالیت پشه خاکی‌ها مورد توجه قرار گرفت.

روش کار

این یک مطالعه توصیفی بصورت مقطعی می‌باشد. در این مطالعه، پشه خاکی ماده، برای تعیین آلودگی لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از نقشه‌های جغرافیایی محلی و استفاده از GPS، روستاهای موردنظر انتخاب و وضعیت روستاها و مناطق مورد مطالعه مشخص گردید. برای جمع‌آوری نمونه پشه خاکی، از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و آسپیراتور استفاده شد [۱۵-۱۳]. حجم نمونه بنابر پیشنهاد مشاور آمار با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$n = \frac{2 \times (Z_1 \frac{\alpha}{2} \pm Z_1 - \beta)^2 [P(1-P)]}{(P_1 - P_2)^2}$$

پشه خاکی‌ها با دود سیگار و یا قرار دادن در فریزر کشته و در الکل ۹۶٪ درفریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت کارهای مولکولی نگهداری می‌شدند. تیوپ‌های حاوی پشه خاکی‌ها به یخ منتقل، سپس به پتری دیش شیشه‌ای حاوی ۱٪ مایع ظرفشوئی در آب استریل منتقل و به مدّت دو دقیقه قرار می‌گرفتند. سپس با سمپلر، مایع ظرفشوئی ۱٪ را در آب استریل خالی نموده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدّت پنج دقیقه در آب استریل، دو بار شسته می‌شدند. هر پشه خاکی را روی یک قطره 1 x TE بر روی اسلاید تمیز زیر لوپ قرار داده، سپس سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا می شد [۱۷،۱۶] و مابقی جهت جدا کردن DNA داخل میکروتیوب قرار داده شده و تشریح می شد. استخراج و جداسازی و خالص‌سازی DNA پشه خاکی‌ها با استفاده از روش Ready و همکاران [۱۸] و روش پرویزی و همکاران (۲۰۰۵) انجام می‌گرفت. محصول PCR بدون کلون کردن و بطور مستقیم تعیین توالی گردید تا مجموعه هاپلوتایپ‌های اختصاصی گونه‌ها و استرین‌های لیشمانیا را تشخیص دهد. واکنش تکثیر (Master Mix) که مجموعا ۲۰ میکرولیتر بود، با محتویات و حجم و مقدار مواد به صورت زیر است:

[1x Taq polymerase buffer B (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 60 µM each dNTP, 1 µM primer IR1, 1 µM primer IR2, 1 unit Taq polymerase (Promega) and 6.7-10.0% of the total DNA extracted from an individual female sandfly (1.0-1.5 µl out of 15 µl DNA dissolved in 1x Tris-EDTA)].

تکثیر ژن‌ها با PCR در دو مرحله و دو میکروتیوپ مجزا [۱۳] صورت گرفت.

در مرحله اول PCR از جفت پرایمرهای قسمت انتهائی (3′) از ژن (SSU rRNA) به نام پرایمر IR1 (forward primer) با نوکلئوتیدهای (5'GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGA TCATT 3') و قسمت انتهائی (5′) از ژن (LSU rRNA) به نام پرایمر IR2 (reverse primer) با نوکلئوتیدهای (5′GCGGGTAGTCCTGCCAAAC ACTCAGGTCTG 3') استفاده گردید. در مرحله دوم از (Nested-PCR) پرایمر از روی هم افتادن ITS2 و قسمت انتهائی (3′) از ژن (SSUrRNA) به نام پرایمر(forward primer) ITS1F با نوکلئیدهای (5′ GCAGCTGGATCATTTTCC 3') و نیز از پرایمر بازگشت بنام ITS2R4 با نوکلئوتیدهای (5′ ATATGCAGAAGAGAGGAGGC 3′) در قسمت انتهائی (5′) ژن ITS2 استفاده گردید.

واکنش تکثیر DNA در داخل میکروتیوپ مخصوص با دیواره نازک انجام و در داخل دستگاه PCR به نام Perkin Elmer (PE) GeneAmp®PCR Thermocycler 9700 (0.2 ml block) قرار داده می‌شد. از برنامه دمائی بدین شرح استفاده شد: الف- ۹۴°C بمدت ۳ دقیقه برای جدا شدن رشته‌های الگو ب- ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه ج - ۵۸°C بمدت ۳۰ ثانیه د-۷۲°C بمدت ۹۰ ثانیه (مرحله ب تا د ۳۷ بار تکرار می‌شد) م- ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه (برای

www.SID.ir

Archive of SID

اطمینان از ساخت کامل تمامی قطعات) و- ٤°C تا زمان بررسی نمونه‌ها. مرحله دوم Nested-PCR در یک میکروتیوپ مجزا و واکنش تکثیر که مجموعا ۲۰ میکرولیتر و با محتویات و حجم و مقدار مشابه مرحله اول بود انجام گرفت، جز اینکه از پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 و یک میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول استفاده شد. برنامه دمائی دستگاه PCR مشابه مرحله اول بود که شرحش داده شد. در هر مرحله از PCR از کنترل منفی استفاده می‌شد تا آلودگی‌های احتمالی نیز تست شود.

وقتی جفت پرایمرهای ITS1F و ITS2R4 در اولین Nested-PCR مورد استفاده قرار گرفت اندازه قطعات DNA حدوداً ٤۲۰ جفت باز بود.

مابقی همه جزئیات کارهای تجربی مشابه Nested-PCR قسمت اول بوده جز اینکه بجای ۱/۵ میکرولیتر DNA جداسازی و خالص سازی شده از پشه خاکی‌ها که همیشه به مرحله اول PCR اضافه می‌گردید، در مرحله دوم ۱ میکرولیتر از محصول مرحله اول PCR به هر تیوپ اضافه می‌شد. برای قطعه میکروساتلایت ژن یک منطقه پلی مورفیسم میکروساتلایت DNA با تکرار AT در قسمت انتهائی (5′) توالی ژن ITS2 در ردیف توالی لیشمانیا در ژن ITS- rDNA تشخیص داده شد. بر اساس این ردیف توالی، یک جفت پرایمر برای تکثیر یک قطعه کوچک که شامل تکرار AT میکروساتالایت نیز بوده است طراحی شد [۱].

همچنین میکروساتالایت DNA با تکرار GT در قسمت قطعه (5′) توالی ژن ITS2 بود اما هیچگونه پلی مورفیسم خاصی در میان سه انگل لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم مشاهده نگردید. شرایط مرحله اول PCR به همان ترتیب که قبلاً شرح داده شد باقی ماند و Nested PCR برای این قطعه کوچک نیز در تیوپ مجزا مجدداً انجام گرفت.

پرایمر مستقیم(forward) ITSmF1 با نوکلئوتیدهای (5′ -GTGTGGAAGCCAAGAGGAGG 3′) که در قسمت انتهائی (5′) توالی ITS2 بود و پرایمر بازگشت (reverse) ITSmR2 با نوکلئوتیدهای (5′ GCAAGCACCAGAGAGGAGT 3′) که در بین ITS2 قرار دارد استفاده شد. مابقی همه جزئیات کارهای تجربی مشابه Nested-PCR قسمت اول بوده، جز اینکه در میکروساتلایت Nested-PCR، ۳۵ بار تکرار انجام می‌شد و دمای جفت کردن[1] نیز ٥٤ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه بوده است. کلیه محصولات PCR بطور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند تا مجموعه‌های هاپلوتایپ‌های گونه‌ها و استرین‌های لیشمانیا مشخص گردد [۲،۱].

با توجه به مطالعات گذشته دو قطعه از ژن ITS-rDNA و با استفاده از روش Nested PCR، DNA موجود در ژنوم پشه خاکی و در مواردی که آلودگی لیشمانیایی در پشه خاکی‌ها بود تکثیر گردید و با انجام سکانس و تعیین توالی و مقایسه و انجام آنالیزهای فیلوژنتیکی همچون بسیاری از مقالات منتشر شده نوع انگل لیشمانیا شناسایی و مورد تایید قرار می‌گرفت [۱٤،۱۳،۱]. یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسیدآمینه با کیت ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه (373/377 sequencing systems ABI, PE Applied Biosystems) مورد استفاده قرار گرفت. جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها وتنظیم 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 بهره گرفته شد [۱٤].

یافته ها

[1] Annealing

www.SID.ir

Archive of SID

در مجموع ۱۴۶ عدد پشه خاکی ماده از تعداد زیاد پشه خاکی صید شده، جهت تعیین آلودگی لیشمانیائی پشه خاکی ها حداقل شامل ٤ گونه از زیر جنس لاروسیوس، ۲ گونه از زیر جنس آدلریوس، ۱ گونه از زیر جنس فلبوتوموس، ۲ گونه از زیر جنس پارافلبوتوموس و ۲ گونه از زیر جنس سرژنتومیا بودند. از همه ۱۴۶ نمونه، DNA استخراج و با استفاده از اسلایدهای تثبیت شده تعیین گونه شدند.

با استفاده از روش‌های مولکولی انتخاب گردید. این

این نمونه‌ها از ۲۵ روستا انتخاب گردیده بودند (شکل۱، جدول۱).

همچنین آلودگی پشه‌ها با استفاده از دو قطعه ژن ITS1-5.8S-ITS2 و قطعه میکروساتلایت ITS-rDNA (جدول ۱، جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۱: ردیابی انگل لیشمانیا در روستاهای مورد مطالعه با استفاده از قطعه میکروساتلایت ژن (ITS-rDNA)

زیرجنس	گونه های پشه خاکی	روستاهای مورد مطالعه																									جمع کل	
		خرم آباد	ابدانان	کوه سفید	چغا سبز	آبگینه	سیمره	کرانه	کوشک	ابراهیم آباد	چغا شیخ	کلاه چغا	سیمره	سرابله	چغا کبود	تنگ تاج	دره شهر	دره تل	چغا سرخ	چغا کبود	چغا کبود	چغا کبود	چغا کبود	چغا کبود	چغا کبود	چغا کبود		
Larrossius	P. keshishiani	۱																									۱	۱۲
	P. kandelakii																									۱(۵)	۱(۵)	
	P. tobbi									۱																	۱	
	P. perfiliewi		۱(#۱)		۲		۱		۲	۳		۲(#۱)															۵	۲
	major group				۱		۱			۱																		۱	۱
Adlerius	P. chinensis group	۲۸(۵)		۱				۱	۸(#۱)		۱	۲(۱#)		۱	٤	۱	۱										۶(۳۵)	۱
	P. brevis	۲						۱																				
	Adlerius spp	۱																										٤
Phlebotomus	P. papatasi	۶																									۲	
Paraphlebotomus	P. sergenti	۹(۲)												۱													۱(۵)	۲
	P. caucasicus	۱(۱)																									۱(۵)	
	P. caucasicus group	۱(۱)																									۱(۵)	
Sergentomiya	S. sintoni	۱																									۱	
	S. dentata	۱																									۱	
	Sergentomiya spp	۱۹(۱)	۱(#۱)	۱	٤	۱	۲	۱	۱	۱	۲	۱	۱	۱	٤	۱	۲	۱	۲	۲(۱)	۱	۱	۶(۱)	۱	۸(۲)	۲	۵	۲۳(۷)
جمع کل		۱۲۶(۱۲)	۱(۱)	۱۲(۱)	۶	۳	۲	۲	۲(۱)	۳	۲	۵	۲	۱	٤	۱	۱	۲	۱	۱	۱	۱	۶(۱)	۱	۸(۲)	۲	۱	۲۳(۷)

(§ = لیشمانیا ماژور # = لیشمانیا ترویکا ‡ = لیشمانیا اینفانتوم)

www.SID.ir

Archive of SID

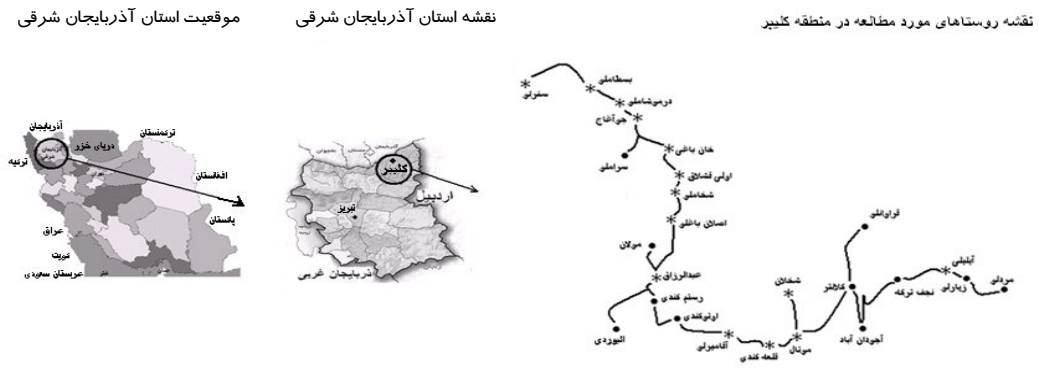
جدول ۲. ردیابی انگل لیشمانیا با استفاده ازقطعه ITS1-5.8 S-ITS2 در گونه های پشه خاکی های جمع آوری شده در سالهای ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ در کلیبر

قطعه ITS1 -5.8s ITS2 .	تاریخ جمع آوری نمونه ها														گونه های پشه خاکی	زیر جنس
	مهرماه		شهریورماه		تیرماه			خردادماه						شهریور		
	۹۷/۸/۳	۹۷/۸/۸	۹۷/۸/۱۸	۹۷/۸/۱	۹۷/۷/۲۱	۹۷/۸/۱	۹۷/۷/۱۸	۹۷/۶/۳۱	۹۷/۶/۲۱	۹۷/۶/۱۱	۹۷/۶/۱	۹۷/۵/۳۱	۹۷/۵/۲۱	۹۷/۵/۱۱		
۱											۱			۱	*P. keshishiani*	***Larrossius***
۶(۱§)											۱(۱§)				*P. kandelakii*	
۱														۱	*P. tobbi*	
۵۱(۴۱)	۱۶(۴۱)		۷		۲	۴	۲				۱			۲	*P. perfiliewi*	
۱۸	۱	۱			۲	۱	۱	۱	۲	۱	۲				*major group*	
۲۸(۳§)	۳	۲	۲			۱	۲				۴(۳§)				*P. chinensis group*	***Adlerias***
۲					۲										*P. brevis*	
۱														۱	*spp*	
۶														۴	*P. papatasi*	***Phlebotomus***
۹(۱§)			۱	۱							۱(۱§)			۲	*P. sergenti*	***Parapheletomus***
۱(۱§)											۱(۱§)				*P. caucasicus group*	
۱(۱§)											۱(۱§)				*P. caucasicus group*	
۱											۱				*S. sintoni*	***Sergentomiya***
۱										۱					*S. dentata*	
۱۹	۱			۱	۹	۲				۲	۳			۱	*Sergentomiya spp*	
۱۴۶(۸)	۲۰(۱)	۳	۱۱	۲	۲۲	۱۱	۳	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱۲	جمع	

(§ = لیشمانیا میجر # = لیشمانیا تروپیکا ¥ = لیشمانیا ایتالیکوم)

www.SID.ir

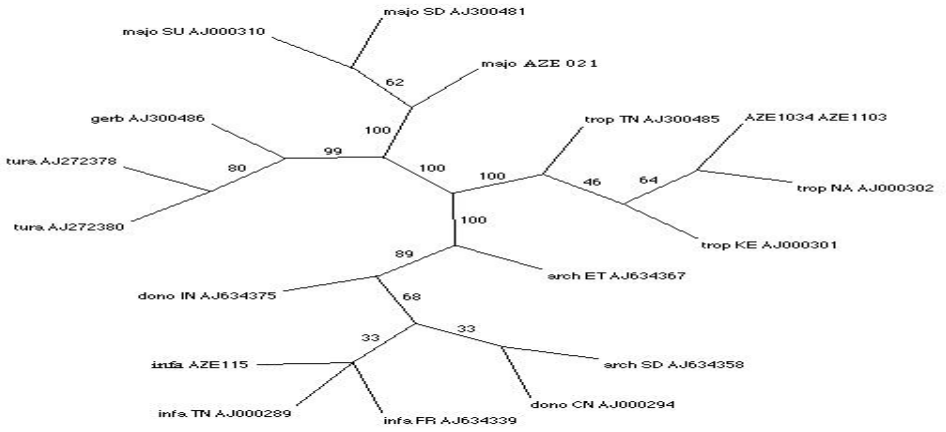
Archive of SID



* روستاهایی که قبلاً طی یک طرح تحقیقاتی از قلاده سگ آغشته به حشره کش جهت جلوگیری از گزش پشه خاکی ها استفاده شده است

● روستاهای کنترل که در طرح تحقیقاتی از قلاده سگ آغشته به حشره کش جهت جلوگیری از گزش پشه خاکیها استفاده نشده است

شکل ۱. نقشه مناطق مورد مطالعه پشه خاکی های جمع آوری شده جهت تعیین آلودگی لیشمانیایی



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی یک قطعه از ژن ITS1-5.8S- ITS2 شامل سه هاپلوتایپ از سه لیشمانیای جدا شده از پشه خاکیهای منطقه کلیبر به انضمام هاپلوتایپ‌های لیشمانیاهای بدست آمده از بانک جهانی ژن با استفاده از آنالیز parsimony **analysis with branch-and bound Search و نرم افزار PAUP***

این نمونه‌ها در شهریور ماه سال ۸٤ و ۸۵ و نیز در خرداد، تیر و مهرماه ۸۵ جمع‌آوری شده بودند (جدول ۲). از قطعه بلند ژن ITS1-5.8S- ITS2 از مجموع ۱٤۶ مورد، ۹ مورد دارای آلودگی لیشمانیائی بوده که پس از سکانس و تعیین توالی ۷ مورد مربوط به لیشمانیا میجر، یک مورد لیشمانیا ترویپکا و یک مورد لیشمانیا اینفانتوم تشخیص داده شد. جالب توجه است که تنها یک مورد لیشمانیا اینفانتوم یافت شده مربوط به شهریور ماه سال ۸٤، در فلبوتوموس پرفیلیوی بود که این گونه به عنوان یکی از ناقلین بیماری در منطقه و در خاور میانه و نیز در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه شناخته شده است و نیز آلودگی در شهریورماه که فصل آلودگی لیشمانیایی احشایی در منطقه در ناقلین است، دیده می‌شود.

همه پشه خاکی‌های آلوده به لیشمانیا میجر در خرداد ماه سال ۸٤ یافت گردیده است. واضح است که لیشمانیا میجر به عنوان عامل بیماری در منطقه

www.SID.ir

Archive of SID

مطرح نیست و نیز در گونه‌هایی یافت شده که قاعدتاً ناقل این انگل نیستند و در خرداد ماه سیکل انگل در پشه خاکی طی نشده و یک مورد نیز لیشمانیا ترویکا مربوط به پشه خاکی‌های گروه میجر در مهر ماه صید شده بود (جدول۲).

از ١٤ مورد آلودگی میکروساتلایت ITS-rDNA پس از سکانس و تعیین توالی ۷ مورد لیشمانیا میجر، ۶ مورد لیشمانیا ترویکا و تنها یک مورد لیشمانیا اینفانتوم تشخیص داده شد که مورد لیشمانیای اینفانتوم در قطعه بلند ITS2 -ITS1-5.8S و از قطعه میکروساتلایت ژن ITS-rDNA مشترک بوده است و این تنها آلودگی لیشمانیای اینفانتوم در فلبوتوموس پرفیلیوی از روستای قراوانلو بود (جدول ۱ و ۲). سه انگل لیشمانیا از قطعه بلند ITS2 -ITS1-5.8S تشخیص و تعیین توالی شدند که ۳ هاپلوتایپ جدید که یک مورد مربوط به انگل لیشمانیا اینفانتوم، یک مورد مربوط به لیشمانیا ترویکا و یک مورد لیشمانیا میجر تشخیص داده شد و در GenBank برای اولین بار ثبت گردید. لیشمانیای اینفانتوم جدا شده از پشه خاکی پرفیلیوی با کد AZE115 پس از ثبت در GenBank با شماره دسترسی EU604810 و لیشمانیا ترویکا با هاپلوتایپ جدید نیز از فلبوتوموس پرفیلیوی با کد AZE1034 از روستای شیخلان با شماره دسترسی EU604811 و لیشمانیا میجر با شماره دسترسی EF413075 از فلبوتوموس کندلاکی از روستای عبدالرزاق تشخیص و تائید گردید. هاپلوتایپ تشخیص داده شده لیشمانیای اینفانتوم با نمونه های همان لیشمانیا از کشور اسپانیا با شماره دسترسی AG000295 و AG634352 و از کشور فرانسه با شماره دسترسی AG634339 و از کشور ایتالیا با شماره دسترسی AG634354 مشابه بوده و تنها در یک نوکلئوتید با لیشمانیا اینفانتوم از کشور تونس با شماره دسترسی AG000289 تفاوت داشته است اما تعداد موقعیت‌های نوکلئوتید از لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیای دونووانی با نمونه‌هایی غیر از حاشیه دریای مدیترانه تفاوت داشته که در درخت فیلوژنی نشان داده شده است (شکل ۲). لیشمانیا اینفانتوم با کد AZE115 با دیگر هاپلوتایپ‌های لیشمانیا اینفانتوم از کشورهای حاشیه مدیترانه در یک شاخه قرار گرفته‌اند و دو هاپلوتایپ لیشمانیا اینفانتوم از کشور سودان با شماره دسترسی AG634161 و AG634370 و سه هاپلوتایپ از لیشمانیا دونووانی از کشورهای هند، اتیوپی و چین با شماره‌های دسترسی AG634375 و AG634377 و AG634360 در یک شاخه قرار گرفته‌اند. هاپلوتایپ لیشمانیا ترویکا به هیچکدام از موارد به ثبت رسیده موجود در بانک جهانی ژن مشابهت نداشته و به نظر می‌رسد که هاپلوتایپ لیشمانیا ترویکا جدید باشد. دو هاپلوتایپ از قطعه میکروساتلایت ITS-rDNA از لیشمانیا اینفانتوم با شماره‌های دسترسی EU604812 برای لیشمانیا ترویکا و EU604813 برای لیشمانیا اینفانتوم در آنالیزهای فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. لیشمانیای میجر تشخیص داده شده با لیشمانیای میجر جداشده از پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در اصفهان یکی بوده که قبلاً با شماره دسترسی EF413075 در بانک جهانی ژن ثبت گردیده است [۱].

بحث

آلودگی‌های لیشمانیائی تشخیص داده شده با روش‌های بیوشیمیائی و یا مولکولی، بیشتر از انسان‌های بیمار و تعداد بسیار کمتر از جوندگان و تعداد خیلی معدود از پشه خاکی‌ها جدا گردیده‌اند. نسبت آلودگی لیشمانیا اینفانتوم در پشه خاکی‌های شناخته شده ناقل بسیار پائین است و این مورد در مطالعاتی که در مناطق آندمیک بیماری در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه مثل کاتالونیا در اسپانیا انجام گرفته نیز صدق می‌کند [۱۹]. بنابراین جای تعجب نیست که تنها در یک پشه خاکی، آلودگی به لیشمانیا اینفانتوم یافت شده است. آلودگی به

www.SID.ir

Archive of SID

لیشمانیا اینفانتوم تنها در پشه خاکی فلبوتوموس پرفیلیوی بوده که به عنوان یکی از ناقلین لیشمانیا اینفانتوم در ایران، خاورمیانه، در جنوب اروپا و شمال آفریقا شناخته شده است [۱۹،۲۰].

بیشتر پشه خاکی‌های ناقل این انگل در کشورهای حوزه دریای مدیترانه همانند فلبوتوموس پرفیلیوی متعلق به پشه خاکی‌های گروه لاروسیوس می‌باشد. قبلاً در شمال غربی ایران، آلودگی لیشمانیایی تایپ نشده و نامشخص در پشه خاکی‌های ناقل احتمالی لیشمانیوز احشائی نوع انسان مثل فلبوتوموس کاندلاکی [۵،۲۱] و فلبوتوموس پرفیلیوی [۵] گزارش شده است. جای تعجب بسیار است که در تعداد بیشتری از پشه خاکی‌های این منطقه، لیشمانیا تروپیکا که عامل بیماری لیشمانیوز نوع شهری و نیز لیشمانیا میجر که عامل بیماری لیشمانیوز نوع روستایی است، در این مطالعه یافت شده‌اند که عوامل این دو نوع از لیشمانیوز در شمال آفریقا و خاورمیانه [۲۲] و نیز در ایران [۲۳،۲۴] را محققین به طور متناوب گزارش نموده‌اند. ناقل لیشمانیوز نوع شهری معمولاً فلبوتوموس سرژنتی [۲۰] و ناقل لیشمانیوز نوع روستائی نیز فلبوتوموس پاپاتاسی است ولی در یافته‌های این تحقیق، لیشمانیا تروپیکا و نیز لیشمانیا میجر از ناقل اصلی خود یافت نشد بلکه در پشه خاکی‌هایی پیدا شد که آن پشه خاکی‌ها به عنوان ناقلین لیشمانیوز نوع احشائی مطرح می‌باشند. هر چند پشه خاکی‌هایی که ناقل لیشمانیا نیستند ممکن است از روی یک مخزن آلوده خونخواری کرده و باعث رشد بعضی از انگل‌ها در خود گردند ولی آن پشه توانایی انجام سیکل کامل انگل را در خود ندارد [۲۰]، بنابراین انگل‌های غیر اختصاصی در پشه-های غیرناقل توانایی رسیدن به شکل بیماریزایی را ندارند. این یافته‌ها فقط می‌تواند نشانگر وجود انواع انگل لیشمانیا در این مناطق باشد و نیاز به مطالعات بیشتر دارد تا خصوصیات و شرایط دیگر بررسی گردد که نشان دهد کدام پشه خاکی به عنوان ناقل بیماری شناخته شود [۲۵]. گزارشات دیگر نیز وجود احتمالی آلودگی لیشمانیا تروپیکا را در پشه خاکی‌های ایران معلوم کرده است [۲۴،۲۶].

وجود انگل لیشمانیای میجر و لیشمانیای تروپیکا در پشه خاکی‌های گونه‌های لاروسیوس و یا آدلریوس در ابتدای فصول فعالیت پشه خاکی‌های بالغ و عدم یافت این دو انگل در این پشه خاکی‌ها در انتهای فصول فعالیت که آلودگی دیده می‌شود، بیان کننده این مطلب می‌باشد که این گونه‌های پشه خاکی‌ها نمی‌توانند سیکل کامل انگل را در بدن خود طی نمایند و احتمالاً انگل به غدد بزاقی این پشه‌ها نمی‌رسد تا در اثر نیش زدن، انگل را به میزبان خود منتقل نمایند. علاوه بر آن تکنیک PCR نمی‌تواند وجود انگل را در غدد بزاقی و یا در معده پشه متمایز نماید. تحقیقاتی که در یونان انجام شده است انواع انگل را در گونه های متعددی از پشه ها با استفاده از روشهای مولکولی تعیین نمودند، حتی در پشه هایی که اصلاً به عنوان ناقل مطرح نبوده و نیستند[۲۷]. البته در مطالعات اخیر گزارشاتی از وجود انگل تروپیکا به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز احشایی در انسان و سگ گزارش گردیده است. دکتر البرزی و همکاران در سال۲۰۰۶ در جنوب ایران انگل لیشمانیا تروپیکا را در انسان گزارش نموده [۲۸] و همچنین در گزارشی دیگر در سربازان آمریکایی مبتلا به لیشمانیوز احشایی در عراق، انگل لیشمانیا تروپیکا را جدا نموده اند [۲۹]. آلودگی لیشمانیا تروپیکا در سگهای خانگی در منطقه اندمیک بیماری لیشمانیوز احشایی در استان اردبیل که هم مرز با منطقه مطالعاتی ما در کلیبر می باشد و نیز در نقاط دیگر گزارش گردیده است [۳۰،۳۱].

نتیجه گیری

وجود و تشخیص ۳ گونه لیشمانیای اینفانتوم، تروپیکا و میجر در پشه خاکی های منطقه اندمیک لیشمانیوز

www.SID.ir

Archive of SID

احشایی در منطقه کلیبر فقط نشان می دهد که چه انگل هایی از لیشمانیا در این منطقه وجود دارد و نیاز به کار گسترده و بیشتری است تا تعداد آلودگی های خیلی بیشتر در انواع گونه های پشه خاکی ها مشخص گردیده و پس از تایپ مولکولی در فصول مختلف نوع انگل کاملاً مشخص گردد و دیگر ویژگی ها و خصوصیات یک ناقل نیز مشخص شود [۲۵].

این بررسی ها می تواند در دیگر نقاط ایران و دنیا انجام گیرد. چنانکه در یافته‌های منتشره از آلودگی لیشمانیائی در اصفهان و ترکمن صحرای ایران که مناطق اندمیک لیشمانیوز جلدی روستایی ایران است بیش از یک گونه انگل لیشمانیا را تشخیص و تایپ مولکولی نموده‌اند [۱].

تحقیقات گذشته مبنی بر استفاده از قلاده سگ آغشته به حشره کش در کاهش سگهای آلوده انجام گرفته، ولی شیوع بیماری همچنان در بین مردم وجود دارد که نیاز به تحقیقات بیشتری است که تنها سگ ها مخزن بیماری در منطقه نیستند و لازم است دیگر گوشتخواران از قبیل روباه و شغال نیز به عنوان مخزن بیماری مدنظر قرار گیرند و ممکن است پشه ها به جای سگ ها، انگل لیشمانیا را از روباه و شغال گرفته و به انسان منتقل نمایند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقای مهدی باغبان، از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی که در جمع آوری نمونه پشه خاکی کمک شایانی نمودند، تشکر می‌نمایند. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتو پاستور ایران به طرح مصوب ۳۲۸ تامین گردیده است.

References

1- 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 Sep; 13: 1159-1171.

2- Parvizi P, Mazloumi-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. 2008 Sep; 102(9): 891-7.

3- Davies CR, Mazloumi-Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral Leishmaniasis: a prospective study in Iran. Parasitology. 1999 Sep; 119: 247-257.

4- Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi SH, Zarei Z, et al. Epidemilogical aspects of canine visceral Leishmaniosis in the Islamic Repoblic of Iran. Vet Parasitol. 2005 May 15; 129(3-4): 243-251.

5- Nadim A, Javadian E, Tahvildari-Bidruni GH, Mottaghi M, Abai MR. Epidemiological aspects of Kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: investigation on vectors. Iran J Public Health. 1992 Spring; 21: 61-72.

6- Gavgani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence rate of zoonotic visceral *Leishmaniasis* in children: a matched-cluster randomized trial. Lancet. 2002 Aug; 360: 374-379.

7- Gavgani ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leshmania infantum*. Am J Trop Med Hyg. 2002 Nov; 67: 511-515.

8- Mohebali M, Edrissian GH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B and et al. Application of *Direct Agglutination Test (DAT)* for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral Leishmaniasis in Iran. Iranian J Parasitol. 2006 Jan; 1(1): 15-25.

www.SID.ir

Archive of SID

9- Oshaghi MA, Maleki N, Hide M, Javadian EA, Rasi Y, Sadraei J and et al. *Phlebotomus Perfiliewi transcaucasicu* is circulating both *Leishmania donovani* and *L.Infantum* in north west Iran. Exp Parasitol. 2009 Nov; 123(3): 218-225.
10- Rasi Y, Firouzi R, Javadian E. Status of probable vectors of visceral Leishmaniosis in endemic focus of Kaleybar county in east Azerbaijan, Iran 1998. Modares J of Medical sciences(Pathobiology). 2000 Spring-Summer; 3(1): 9-14. (Full text in Persian)
11- Rasi Y, Zahrai Ramezani AR, Kavarizadeh F. A study of sandflies fauna in the focus of visceral Leishmaniasis in Ahar district (Eastern Azarbayjan, Iran). J of ILAM univ of Med science. 2009 Summer; 17(2): 50-53. (Full text in Persian)
12- Dye C, Guy MW, Elkins DB, Wilkes TJ, Killick-Kendrick R. The life expectancy of *Phlebotomine sandflies*: first field estimates from southern France. Med Vet Entomol. 1987 Oct; 1(4): 417-425.
13- Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of *Leishmania* major in peridomestic Iranian sandflies: comparsion of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Trop. 2005 Jan; 93(1): 75-83.
14- Swofford DL: 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
15- Sudia WD, Chamberland RW. Battery-operated light trap, an improved model. Mosquito News. 1962 Summer; 22: 126-129.
16- Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus (Diptera: Psychodidae)*. Bull Brit Mus Nat Hist Ent. 1982 Aug; 45: 121–209.
17- Nadim A, Javadian E. Key for species identification of sandflies *(Phlebotominae; Diptera)* of Iran. Iran J Public Health. 1976 Spring; 5: 35-44. (Full text in Persian)
18- Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Souza AA. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus (Diptera: Psychodidae)*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991 Jan-Mar; 86(1): 41-49.
19- Gallego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP and et al. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies: also literature review of distribution and hosts of *L. infantum zymodemes* in the old World. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun; 95(3): 269-271.
20- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the Leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol. 1990 Jan; 4(1): 1-24.
21- Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Zahraii A, Vatandoost H, Motazedian H and et al. *Phlebotomus (Laroussius) kandelakii*, the principal and proven vector of visceral Leishmaniasis in north west of Iran. Pakistanian J Biol Science. 2005 Dec; 8: 1802-1806.
22- Desjeux P. The increase in risk factors for Leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun; 95(3): 239-243.
23- Mohebali M, Javadian E, Yaghobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J. 2004 Jul-Sep; 10(4-5): 591-599.
24- Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of *Leishmaniasis* in Iran. Acta Med Iran. 1971 Spring; 14: 99-106.
25- Killick-Kendrick R, Ward RD. Ecology of *Leishmania*. Parasitology.1981 Summer; 82: 143-152.
26- Berenji F, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hanafi-Bojd AA, Fata A. A study on the vectors of the cutaneous Leishmanasis in the northern part of Mashad, Iran. Arch Iran Med. 2006 Spring; 9: 1-6.
27- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol. 2000 May; 66(5): 1933-1938.

www.SID.ir

Archive of SID

28- Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A. *Leishmania tropica*–isolated patient with visceral Leishmaniasis in southern Iran. Am J Trop Med Hyg. 2006 Feb; 74(2): 306-307.
29- Crum NF, Aronson NE, Lederman ER, Rusnak JM, Cross JH. History of U.S. Military contributions to the study of parasitic diseases. Military Med. 2005 Apr; 170(4): 17-29.
30- Hajjaran H, Mohebali M, Zarei Z, Edrissian GH. *Leishmania tropica*: Another etiological agent of canine visceral Leishmaniasis in Iran. Iran J Public Health. 2007spring; 36: 85-88.
31- Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol. 2002 Jan; 96 (1): 31-4.

www.SID.ir

Archive of SID

Simultaneous Detection of of Three *Leishmania* Species in Kaleybar, a Focus of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Iran

Parvizi P, PhD[1]; AlaeeNovin E, BSc [2]

[1] Corresponding Author: Associated Prof. of Medical Entemology, Dept. of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran . E-mail: parp@pasteur.ac.ir
[2] BS.c in Biology, Dept. of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background & Objectives: *Leishmania infantum* is the causative agent of visceral leishmaniasis (VL). Based on isoenzyme typing of a few isolates from patients and domestic dogs, this parasite was considered to predominate in the Kaleybar focus of VL in northwest Iran. There is no report of sandfly infections in this region so this study was aimed to investigate the infection of the sandflies in the field.

Methods: Sandflies were sampled using sticky paper and CDC traps. Morphological identifications were carried out based on characters of the head and abdominal terminalia. DNA extracted from sandflies abdomens and thoraxes. ITS-rDNA gene of parasite was detected and identified *as Leishmania* after sequencing.

Results: Out of 146 sandflies 9 were found to be infected with *Leishmania*. For first time, three *Leishmania species* (*L. infantum*, *L. tropica* and *L. major)* were identified in sandflies simultaneously in the region. Among the all sandflies only one *Phlebotomus perfiliewi* (vector of VL) was found to be infected with *L. infantum*. All Isolates were confirmed by sequencing of ITS-rDNA gene.

Conclusion: However, *Leishmania tropica* and *L. major* were found more than *L. infantum* in sandflies in Kaleybar but it could not conclude that these two species of *Leishmania* are causative agents of VL. Because many criteria should be considered to incriminate an agent or vector of the disease.

Key words: *Leishmania Infantum*; *Leishmania Tropica*; Diagnostic ITS-rDNA PCR; *Phlebotomus Perfiliewi*; *V*isceral Leishmaniasis

www.SID.ir