ORIGINAL ARTICLE

Isolating and Determining Leishmania Major and Leishmania Turanica in Phlebotomus Papatasi in Golestan Province

Mona Roshanghalb[1,2],
Parviz Parvizi[2]

[1] Department of Parasitology, Molecular Systematics Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

(Received September 12, 2011 ; Accepted January 16, 2012)

Abstract

Background and purpose: Leishmaniasis is an important tropical disease in Iran and the world. Despite extensive effort to make a vaccine, no success was achieved. Moreover, routine methods have failed to control and cut the spread of this disease. Hence, the major aim of this study was to identify and determine the *Leishmania* infections in the vector and the ecological and biological criteria of the vector by using new molecular methods to regionally control leishmaniasis.

Materials and methods: Head and abdominal terminalia of the sandflies collected on sticky papers and CDC traps were dissected and mounted on the slide. Then, the species were determined using microscope and morphological keys. Furthermore, DNA was extracted from the dissected thorax and attached anterior abdomen of the sandflies. *Leishmania* parasite was detected and identified using digestion of restriction enzyme (RFLP) and sequencing of ITS-rDNA gene.

Results: Out of 168 *Phlebotomus papatasi*, 18 had *Leishmania* infection. Two species of *Leishmania major* and *Leishmania turanica* were identified in *Phlebotomus papatasi* in Turkmen Sahara. Identification of these two parasites was confirmed after amplifying ITS-rDNA gene using Nested PCR, RFLP and sequencing.

Conclusion: Using new molecular methods, it was reconfirmed that *Leishmania major* was the causative agent and *Phlebotomus papatasi* was a vector of rural zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) in Turkmen Sahara and Iran. Finding *Leishmania turanica* in *Phlebotomus papatasi* and in reservoirs can indicate the role of this parasite in the durability and stability of the disease cycle.

Key words: *Leishmania major*, *Leishmania turanica*, *Phlebotomus papatasi*, ITS-ribosomal DNA

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 74-83 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۸۳-۷۴)

جداسازی و تعیین هویت انگل لیشمانیا میجر و لیشمانیا تورانیکا در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی استان گلستان

مونا روشن قلب[۲،۱]
پرویز پرویزی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری لیشمانیوز یکی از بیماری مهم مناطق گرمسیری در جهان و ایران می‌باشدکه علی‌رغم تلاش‌های گسترده برای ساخت واکسن تاکنون موفقیتی به همراه نداشته و دیگر روش‌های متداول کنترل نیز نتوانسته است از گسترش روز افزون بیماری بکاهد. لذا شناخت و تعیین هویت انگل لیشمانیا در ناقل با استفاده از روش‌های نوین مولکولی هدف اصلی تحقیق است، تا بتوان با تعیین هویت انگل و دیگر خصوصیات اکولوژی و بیولوژی ناقل، برای کنترل بیماری به‌صورت منطقه‌ای برنامه‌ریزی کرد.

مواد و روش‌ها: پشه‌های خاکی با استفاده از تله چسبان و تله نورانی صید شدند، سپس سر و انتهای بدن پشه‌های خاکی جدا و روی لام مونته قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ و کلید تشخیصی گونه‌های آن‌ها تعیین شد. از شکم و سینه برای استخراج DNA استفاده شد. انگل لیشمانیا با استفاده از ژن ITS-rDNA ردیابی و با روش آنالیز هضم آنزیمی (RFLP) و نیز تعیین توالی شناسایی شد.

یافته‌ها: از ۱۶۸ پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی صید شده، تعداد ۱۸ عدد دارای آلودگی لیشمانیایی با دو گونه انگل لیشمانیا میجر یا تورانیکا بودند که پس از تکثیر ژن ITS-rDNA و با Nested PCR و RFLP و تعیین توالی،این یافته مورد تأیید قطعی قرار گرفت.

استنتاج: با استفاده از روش‌های نوین مولکولی، لیشمانیا میجر به‌عنوان عامل و فلبوتوموس پاپاتاسی به‌عنوان ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران و منطقه ترکمن صحرا مورد تأیید مجدد قرار گرفت. وجود لیشمانیا تورانیکای غیربیماری‌زا در فلبوتوموس پاپاتاسی و مخازن حیوانی، می تواند نقش این انگل را در دوام و پایداری سیکل بیماری مطرح سازد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا میجر، لیشمانیا تورانیکا، فلبوتوموس پاپاتاسی، ITS-ribosomal DNA

مقدمه

لیشمانیوز جلدی بعد از تریپانوزوم آفریقایی، تب دانگ و مالاریا، بیماری مهم منتقله از ناقلین می‌باشد که در دنیا سالانه ۲ تا ۳۵۰ میلیون نفر در معرض این عفونت انگلی با تظاهرات مختلفش قرار دارند(۲،۱). لیشمانیوز جلدی روستایی، ۸۰ درصد کل بیماری لیشمانیوز گزارش شده می‌باشد که ۹۰ درصد آن در کشورهایی

مولف مسئول: پرویز پرویزی- تهران: انستیتو پاستور ایران، گروه انگل شناسی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی E-mail: parp@pasteur.ac.ir
۱. آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، گروه انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
تاریخ دریافت : ۹۰/۶/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۹/۱۹ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۰/۲۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

همچون ایران، افغانستان، سودان، عربستان سعودی، سریلانکا، برزیل، ژاپن، پرو و الجزایر رایج است(۴،۳).

پراکندگی گسترده‌ی بیماری در سرتاسر جهان (۶۶ کشور در دنیای قدیم و ۲۲ کشور در دنیای جدید) به‌جز منطقه ی جنوب شرقی آسیا، استرالیا و قطب جنوب اهمیت مطالعه بر روی لیشمانیوز جلدی را افزایش می‌دهد(۵،۳). انگل لیشمانیا میجر عامل، پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی[1] و جوندگان گروه جربیلیده مخازن اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران می باشند(۷،۶).

تعداد زیادی از پشه خاکی‌های صید شده از مناطق آلوده لیشمانیوز جلدی در اصفهان و دیگر مناطق آلوده لیشمانیوز جلدی تشریح شده‌اند و آلودگی لپتومونـاد گزارش شده است؛ از جمله در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی، گونه‌هایی از زیر جنس پارافلبوتوموس (شامل فلبوتوموس کوکازیکوس/ فلبوتوموس مونگولنسیس)، فلبوتوموس انصاری، سرژنتومیا سینتونی و گونه‌های دیگر پشه خاکی از جنس سرژنتومیا که اغلب نوع گونه‌های پشه خاکی جنس سرژنتومیا تشخیص داده نشده است(۸- ۱۴).

در گذشته امکان تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی وجود نداشته و یا بسیار محدود بوده است. ولی امروزه با استفاده از روش‌های جدید همچون تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن مورد مطالعه و آنالیز فیلوژنتیک، تعیین هویت انگل لیشمانیا و نوع آلودگی‌ها با دقت و حساسیت بیشتری انجام می شود(۱۶،۱۵). آلودگی در پشه خاکی‌ها اغلب با تعداد کم انگل لیشمانیا همراه می‌باشد. روش ایزوآنزیم به‌عنوان روش استاندارد طلایی[2] مطرح بوده است ولی اکنون ثابت شده است که روش‌های مولکولی در تشخیص آلودگی لیشمانیا حساس‌تر، اختصاصی‌تر وکم‌هزینه‌تر می‌باشد(۵، ۱۹- ۱۷).

برای تعیین یک پشه خاکی به عنوان ناقل بیماری لیشمانیوز، پیداکردن انگل به طور طبیعی در پشه خاکی‌های ماده ضروری است، زیرا تنها پشه خاکی‌های ماده برای بقای زندگی از خون تغذیه می‌کنند و پشه خاکی‌های نر بالغ عصاره‌ی گیاهان را مورد استفاده قرار می‌دهند(۱۹،۲). ولی با این وجود پیدا کردن انگل در پشه خاکی‌های ماده‌ی خون خورده دلیل قطعی بر ناقل بودن آن‌ها نمی‌باشد، زیرا خیلی از آلودگی‌های لیشمانیایی در پشه خاکی‌ها، موقت و زودگذر است. بسیاری از انگل‌ها در هنگام گوارش و هضم خون مکیده شده در پشه خاکی، دفع شده و سیکل آلودگی درآن‌ها به اتمام نمی‌رسد و شکل بیماری‌زای انگل در پشه خاکی کامل نمی‌گردد(۱۹،۲). بنابراین در این مطالعه بیشتر صید پشه خاکی در انتهای فصول فعالیت پشه خاکی‌های بالغ انجام شد تا انگل به شکل آلوده‌کننده‌ی خود تبدیل شده باشد. هر چند در منطقه ترکمن صحرا مطالعات پراکنده و محدود در گذشته انجام شده است که به طور عمده بر اساس روش‌های متداول آزمایشگاهی بوده است و انگل لیشمانیا تایپ نگردیده است. همچنین مطالعات بر روی آلودگی لیشمانیایی در انسان و مخازن حیوانی (جوندگان) صورت گرفته است ولی بر روی ناقلین تحقیقات خیلی محدود بوده است. آلودگی لیشمانیایی در ناقلین با روش‌های ایزوآنزیم و یا مولکولی به‌طور گسترده تایپ نگردیده است. لذا تعیین هویت انگل لیشمانیا و تایپ مولکولی آن در ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA مد نظر قرار گرفت(۱۹،۱۵،۷،۶).

مواد و روش ها

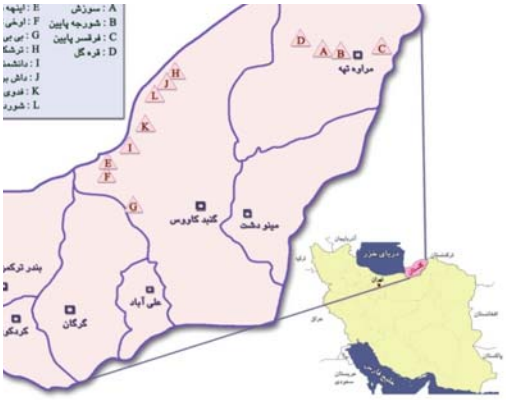
جمع آوری نمونه و استخراج DNA

پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی از مناطق مورد مطالعه، طی سه سال متوالی ۱۳۸۹- ۱۳۸۷، در فصول فعالیت پشه خاکی‌های بالغ، با استفاده از تله چسبان[3]، تله نورانی CDC[4] صید و جمع‌آوری شد. از تله چسبان برای صید فلبوتوموس پاپاتاسی در داخل خانه ها، اصطبل‌ها،

1. Phlebotomus papatasi
2. Golden standard
3. Sticky papers
4. Centers for Disease Control

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مراکز نگهداری حیوانات خانگی، غارها و شکاف‌های طبیعی، داخل لانه‌ها و تونل‌های داخل زمین مختص موش‌های صحرایی و از تله نورانی CDC برای صید پشه از داخل خانه‌ها، اصطبل‌ها، مراکز نگهداری حیوانات خانگی استفاده شد(۲۱،۲۰) (تصویر شماره ۱) (جدول شماره ۱).



تصویر شماره ۱: مناطق مورد مطالعه جمع آوری فلبوتوموس پاپاتاسی جهت تعیین آلودگی لیشمانیایی در ترکمن صحرای استان گلستان

پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی بر روی یک قطره 1 x TE در روی اسلاید تمیز، زیر لوپ قرار داده شد(۲۲،۱۹). سر و انتهای بدن پشه خاکی‌ها با استفاده از محلول برلیز (Berlese) روی لام مونته و با استفاده از میکروسکوپ و کلید تشخیص مورد شناسایی قرار گرفته و تعیین گونه می‌شدند. جداسازی و خالص‌سازی DNA (extraction) پشه خاکی‌ها با استفاده از روش پرویزی و همکاران انجام گرفت(۲۳،۲۲).

PCR با هدف قراردادن ژن ITS-rDNA

در این مطالعه از ژن ITS-rDNA برای تعیین آلودگی لیشمانیایی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در منطقه ترکمن صحرا استفاده شد. این ژن از ژن‌های هسته‌ای است که در بین زیر واحدهای ریبوزومی واقع است. برای تکثیر ژن از دستگاه ترموسایکلر استفاده گردید. برای انجام PCR از دو پرایمر، ITS1F (forward) با نوکلئوتیدهای (5′GCA GCT GGA TCA TTT TCC 3′) و ITS2R4 (reverse) با نوکلئوتیدهای (5′ATA TGC AGA AGA GAG GAG GC 3′) استفاده و یک قطعه که حدود ۴۳۰ جفت باز (بدون احتساب پرایمرها) می‌باشد تکثیر یافت(۱۹).

جدول شماره ۱: ردیابی انگل لیشمانیا با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در فلبوتوموس پاپاتسی، با تمرکز بر وضعیت شکمی، زیستگاه و روش های صید در روستاهای مورد مطالعه در منطقه ترکمن صحرا

مناطق صید پشه خاکی / استان گلستان- منطقه ترکمن صحرا		وضعیت شکمی پشه خاکی				زیستگاه پشه خاکی			روش های صید		تعداد کل فلبوتوموس پاپاتاسی به تفکیک روستا و موارد آلودگی لیشمانیایی	
شهرستان	روستا	تازه خون خورده	باردار	نیمه باردار	لانه‌ی جونده	طویله	اماکن انسانی	تله چسبان	تله نورانی	تعداد کل فلبوتوموس پاپاتاسی	لیشمانیاVe +
گنبد کاووس	ترشکلی	۰	۰	(۲) ۲٤	۰	(۲) ۲٤	۰	(۲) ۲٤	۰	۲٤	۲
	دزاولوم فدوی	۰	۰	۱۱(۱)	۰	۱۱ (۱)	۰	۱۱ (۱)	۰	۱۱	۱
	اینچه برون	۰	۲	۱	۲	۰	۱	۳	۰	۳	۰
	اوخی تپه	۰	۱	٤	٥	۰	۰	٥	۰	٥	۰
	داشلی برون	۱۳	۱۰	(۱*/۱۱**) ٤۷	۷	(۱*/۱۱**) ٦۳	۰	(۱*/۱۱**) ٥۳	۱۷	۷۰	۱۲
	دانشمند	۰	۱	۱۹	۱	۱۹	۰	۲۰	۰	۲۰	۰
	بی بی شیروان	۰	۳	۳	٤	۱	۱	٥	۱	٦	۰
	فرق سر پائین	۰	۰	۸	۰	۸	۰	۸	۰	۸	۰
	سوزش	۰	۰	۲	۱	۰	۱	۲	۰	۲	۰
مراوه تپه	شورجه پائین	۰	۰	۳	۰	۳	۰	۳	۰	۳	۰
	قره گل	۰	۱۱(۱)	۰	٦	٥(۱)	۰	۱۱(۱)	۰	۱۱	۱
	شوردگش	۰	٥(۲)	۰	۰	٥(۲)	۰	٥(۲)	۰	٥	۲
جمع کل			۱٦۸			۱٦۸		۱٦۸		۱٦۸	۱۸

( ) : موارد مثبت انگل لیشمانیا در داخل پرانتز آورده شده است. *: لیشمانیا تورانیکا (*Leishmania turanica*) **: لیشمانیا میجر (*Leishmania major*)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

هضم محصولات PCR به روش RFLP و سکانس توالی‌ها

تمام موارد مثبت محصولات PCR توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت. آنزیم‌های اندونوکلئازی که به آن‌ها آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzyme) نیز می‌گویند، قادرند رشته DNA را در نواحی با توالی خاص بشکنند و لذا قطعات DNA بسته به نوع آنزیم به‌کار رفته و توالی DNA به قطعات مختلف با اندازه‌های متفاوت خرد می‌شوند. انتخاب آنزیم BsuRI در این تحقیق با آنالیز سکانس گونه‌های رفرنس لیشمانیا توسط نرم‌افزار CLC DNA Workbench 5.2 صورت گرفت. پس از الکتروفورز این قطعات را می‌توان مشاهده و با یکدیگر مقایسه کرد. هرگونه از لیشمانیا دارای قطعه یا قطعات اختصاصی می‌باشد(۲۴). در این تحقیق، از آنزیم BsuRI (HaeIII) استفاده شد که DNA را در ناحیه GGCC شناسایی کرده و می‌شکند. محصول ITS1-PCR هر کدام از سویه‌های رفرنس و نمونه‌ها مورد هضم توسط این آنزیم قرار گرفت. تعدادی از محصولات PCR که با روش RFLP تعیین گونه شده بودند و تعدادی نیز که با این روش مشکوک بوده و قابل تشخیص قطعی نبودند، به‌طور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند. برای این منظور ابتدا محصول PCR خالص سازی شد. سپس یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA 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. به‌منظور وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌های سکانس شده، تنظیم توالی و تطبیق نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم‌افزار Sequencher^{Tm} 4.1.4 استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم‌افزار PAUP[1] بهره گرفته شد(۲۵).

یافته‌ها

در مجموع ۱۶۸ پشه خاکی ماده فلبوتوموس پاپاتاسی از میان تعداد زیاد گونه‌های مختلف پشه خاکی صید شده از منطقه، از نظر موفولوژیکی شناسایی و تعیین گونه شد تا آلودگی لیشمانیایی در آن‌ها بررسی گردد. این پشه خاکی‌ها از ۸ روستای شهرستان گنبد و ۴ روستای شهرستان مراوه تپه در ترکمن صحرا صید گردیدند (جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱). وضعیت شکمی، زیستگاه طبیعی و روش صید برای هر پشه خاکی از هر روستا مشخص گردید تا آلودگی لیشمانیایی با توجه به شرایط مذکور تفکیک گردد (جدول شماره ۱). صید پشه خاکی در طی سه سال و از روستاهای مختلف انجام گرفت که جزئیات آلودگی بر اساس تاریخ و سال صید برای هر روستا در جدول شماره ۲ آمده است.

آلودگی‌های لیشمانیائی تشخیص داده شده با Nested PCR از ژن ITS1-5.8S rRNA-ITS2

ژن ITS1-5.8S rRNA-ITS2 انگل لیشمانیا که یک قطعه از ژن ITS-rDNA می‌باشد در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی با روش Nested PCR تکثیر یافت. اندازه طول قطعه با احتساب پرایمرها حدود ۴۸۰ بیس پیر بود در این Nested PCR از جفت پرایمرهای IR1 و IR2 برای مرحله اول و از جفت پرایمرهای ITS1F1 و ITS2R4 برای مرحله دوم استفاده شد. در مجموع در منطقه ی ترکمن صحرا، از ۱۶۸ نمونه پشه خاکی ماده فلبوتوموس پاپاتاسی، ۱۸ مورد آلودگی لیشمانیائی یافت شد.

ابتدا آنزیم BsuRI با آنالیز سکانس‌های موجود در بانک جهانی ژن، گونه‌های رفرانس لیشمانیا، توسط نرم‌افزار CLC DNA Workbench 5.2 انجام و برای هرگونه از لیشمانیا تعداد و اندازه هر قطعه یا قطعات اختصاصی مشخص گردید. آلودگی لیشمانیائی توسط

1. Phylogenetic analysis using parsimony

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

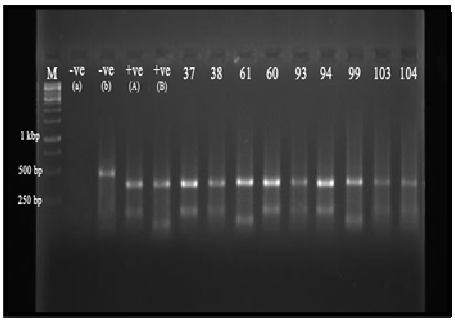
جدول شماره ۲: ردیابی انگل لیشمانیا با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در فلبوتوموس پاپاتاسی به تفکیک تاریخ جمع آوری و محل صید در منطقه ترکمن صحرا

محل صید / تاریخ صید	استان گلستان – منطقه ی ترکمن صحرا											جمع موارد به تفکیک تاریخ
	گنبد کاووس							مراوه تپه				
	شوردگش	ترشکلی	دزاولوم فدوی	اینچه برون	اوخی تپه	داشلی برون	دانشمند	بی‌بی شیروان	سوزش	فرق سر پائین	شورجه پائین	قره گل	
۸۷/۱۰/۹ –۱۰	–	–	–	–	–	۴	–	۳	–	–	–	–	۷
۸۷/۷/۲۲ –۲۳	–	–	–	–	–	–	–	۲	–	–	–	–	۲
۸۷/۷/ ۲۹ –۳۰	–	–	–	۳	۵	–	–	–	–	–	–	–	۸
۸۸/۴/۸ –۹	–	–	–	–	–	–	–	۱	۲	–	–	–	۳
۸۸/۴/ ۱۰ –۱۱	–	–	–	–	–	–	۲۰	–		–	–	–	۲۰
۸۸/۴/۱۳ –۱۴	–	–	–	–	–	۳۰	–	–	–	–	–	–	۳۰
۸۹/۷/۲ –۳	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۸	۳	–	۱۱
۸۹/۷/ ۵ –۶	۵ (۱ ф/۱*)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۵
۸۹/۷/۶ –۷	–	–	–	–	–	۳۶(۱ **/۱۱*)	–	–	–	–	–	–	۳۶
۸۹/۷/ ۷ –۸	–	۲۴ (۲*)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۲۴
۸۹/۷/۸ –۹	–	–	۱۱(۱ *)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱۱
۸۹/۶/۲۹ –۳۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱۱(۱*)	۱۱
جمع کل و موارد آلودگی لیشمانیایی	۵ (۲)	۲۴ (۲)	۱۱ (۱)	۳	۵	۷۰ (۱۲)	۲۰	۶	۲	۸	۳	۱۱ (۱)	۱۶۸(۱۸)

Leishmania major :* *Leishmania turanica* : **

آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت که برای لیشمانیا میجر دو قطعه به اندازه حدودا ۳۳۰، ۱۲۰، برای لیشمانیا تروپیکا ۴ قطعه به اندازه حدودا، ۳۷۰، ۱۰۵، ۳۵ و ۲۵ برای لیشمانیا اینفانتوم ۳ قطعه به اندازه حدودا ۴۱۰، ۸۰، ۳۰، برای لیشمانیا تورانیکا چهار قطعه به اندازه حدودا ۳۵۰، ۱۵۰، ۶۰ و ۴۰ بوده است که معمولا قطعات آخر و زیر ۵۰ بیس پیر در ژل آگاروز قبل مشاهده نیست.

جهت تعیین هویت و گونه انگل لیشمانیا نتایج این تحقیق، محصولات PCR همه ۱۸ مورد مثبت آلودگی لیشمانیایی، توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت. ۱۶ مورد به‌طور قطع لیشمانیا میجر تشخیص داده شد (جدول شماره ۲). آنزیم BsuRI (HaeIII) که DNA را در ناحیه GGCC شناسایی کرده بود، جهت تأیید مجدد و تکمیل تعیین هویت انگل، ۸ نمونه از ۱۸ مورد محصول PCR ژن ITS2 -ITS1-5.8S rRNA ، تعیین توالی گردید که ۶ مورد با توالی‌های ثبت شده از لیشمانیا میجر این ژن در بانک جهانی ژن مطابقت داشت و لیشمانیا میجر در پشه خاکی ماده فلبوتوموس پاپاتاسی در ترکمن صحرا مجدداً مورد تأیید قرار گرفت. دو مورد مثبت دیگر با آلودگی لیشمانیائی توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت و لیشمانیا تورانیکا تشخیص داده شد و نیز برای تعیین توالی ارسال گردید. برای هر دو نمونه سکانس‌ها و توالی‌ها با سکانس ها و توالی های به ثبت رسیده از ژن ITS1- 5.8S rRNA -ITS2 لیشمانیا تورانیکا کاملاً مطابقت داشت و آلودگی لیشمانیا تورانیکا در پشه خاکی ماده فلبوتوموس پاپاتاسی در ترکمن صحرا مورد تأیید قطعی قرار گرفت (تصویر شماره ۲ و جدول شماره ۲).



تصویر شماره ۲: آلودگی لیشمانیایی و تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم BsuR I با تکنیک RFLP در فلبوتوموس پاپاتاسی در منطقه ترکمن صحرا {M : مارکر، Ve (a)- : کنترل منفی فاقد محصول PCR ، Ve (b)- : کنترل منفی فاقد آنزیم BsuR I ، Ve (A)+: کنترل مثبت انگل لیشمانیا میجر، Ve (B)+ : کنترل مثبت انگل لیشمانیا تروپیکا، ۳۷ ، ۳۸ ، ۶۰ ، ۹۳ ، ۹۴ ، ۱۰۳ و ۱۰۴: نمونه های دارای آلودگی لیشمانیا میجر ۶۱ و ۹۹ : نمونه های دارای آلودگی لیشمانیا تورانیکا}

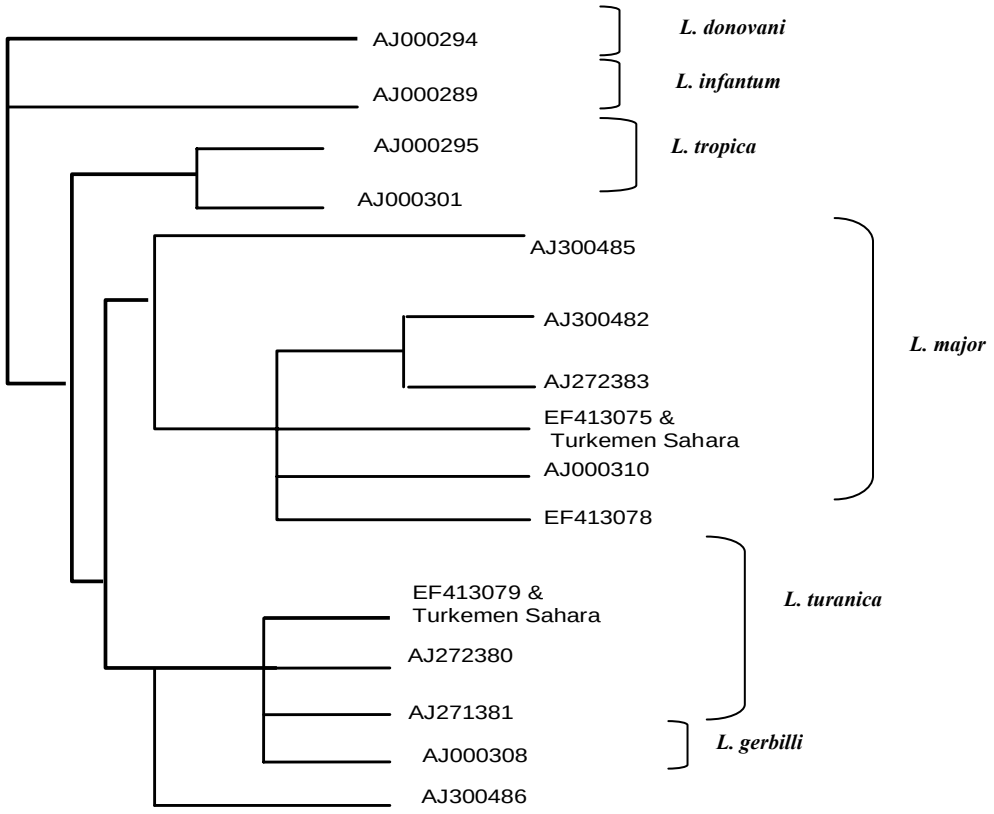
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

بحث

دو انگل لیشمانیا میجر و لیشمانیا تورانیکا در پشه‌خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در منطقه ترکمن صحرای ایران یافت و با سکانس و تعیین توالی بخشی از ژنوم انگل لیشمانیا مورد تأیید قطعی قرار گرفت. در بیشتر نقاط ایران مطالعات گسترده‌ای بر روی عامل لیشمانیوز جلدی در انسان، مخازن حیوانی و ناقلین انجام گرفته است(۲۷،۲۶). در بسیاری از موارد گونه انگل بدون تایپ، لیشمانیا میجر و یا لیشمانیا تروپیکا گزارش گردیده است(۲۶،۲۵). در گذشته تشخیص انگل لیشمانیا با روش‌های متداول آزمایشگاهی انجام می گرفت. لام مستقیم تهیه و پس از رنگ آمیزی با گیمسا انگل لیشمانیا در زیر میکروسکوپ مشاهده و مورد بررسی قرار می‌گرفت و یا انگل لیشمانیا به حیوان حساس آزمایشگاهی تزریق و یا به محیط کشت برده می‌شد. به این دلیل با توجه به اطلاعات کلینیکی، جغرافیایی و روش‌های آزمایشگاهی ذکر شده نوع گونه انگل لیشمانیا در انسان، مخازن حیوانی و ناقلین مشخص می‌گردید که معمولاً بر حسب وفور بیماری به ترتیب لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم برای لشیمانیوز جلدی روستایی، جلدی شهری و لیشمانیوز احشایی اعلام می گردید(۳۰-۲۸). با توجه به به‌کارگیری روش‌های جدید مولکولی در کنار روش‌های سنتی تشخیصی برای لیشمانیوز در سال‌های اخیر، علاوه بر سه انگل لیشمانیای مذکور، انواع انگل‌های لیشمانیا در مخازن و ناقلین در دنیا و بعضی از نقاط ایران گزارش گردیده است. عقیده بر این است که عموم این انگل‌های جدید برای انسان غیر بیماری‌زا می‌باشد(۳۰). در سال‌های اخیر در برخی مطالعات انجام شده در مناطق اندمیکِ لیشمانیا میجر، علاوه بر عامل اصلی بیماری، لیشمانیا تورانیکا، لیشمانیا جربیلی و لیشمانیای جدید نزدیک به لیشمانیا جربیلی از ناقلین (پشه‌خاکی‌ها) یا مخازن حیوانی (جوندگان) گزارش گردیده است(۳۲،۳۱،۱۹). سکانس حاصل از این مطالعه با لیشمانیا میجر به شماره دسترسی EF413075 ثبت شده در بانک جهانی ژن از اصفهان و دیگر کشورها از جمله سودان به شماره دسترسی AJ300481 (MHOM/SD/90/SUDAN3) صد در صد مطابقت داشت. آنالیزهای انجام شده با نرم‌افزار SequencherTm 4.1.4 همچنین مشخص کرد که سکانس لیشمانیا میجر به دست آمده در این مطالعه با سکانس ثبت شده از همین گونه از اصفهان به شماره دسترسی EF413078 در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۸۴ تنها در یک نوکلئوتید تفاوت دارد و به جای G، A قرار گرفته است. مقایسه انجام شده با سکانس لیشمانیا میجر ثبت شده از ترکمنستان به شماره دسترسی AJ272383 نشان از تفاوت در ۳ جایگاه نوکلئوتیدی ۲۵۴، ۳۳۰ و ۳۳۱ داشت. سکانس حاصل از این مطالعه با سکانس لیشمانیا تورانیکا به شماره دسترسی EF413079 ثبت شده در بانک جهانی ژن از ایران صددرصد مطابقت داشت و از دیگر کشورها از جمله مغولستان به شماره دسترسی AJ272380 (strain MNR23) در جایگاه نوکلئوتیدی ۴۲۲ تنها در یک نوکلئوتید تفاوت داشت(۲۹،۱۸). سکانس و توالی به‌دست آمده از این مطالعه و موارد مشابه به‌دست آمده انواع انگل لیشمانیا در دنیای قدیم پس از آنالیز فیلوژنتیکی در نمودار شماره ۱ آمده است.

یافتن گونه‌های انگل لیشمانیا غیر از میجر و تعیین هویت انگل‌های جدید از جمله لیشمانیا تورانیکا در ناقلین و مخازن بیماری می‌بایست نقش آنان در دوام و حفظ بیماری در منطقه، مورد بازبینی قرار گیرد. چراکه عقیده بر این است که انگل لیشمانیای غیر بیماری‌زا برای انسان مانند لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی در حفظ و دوام انگل لیشمانیا میجر در ناقلین و مخازن نقش اساسی دارند(۲۸). بنابراین، یافت انگلی مانند لیشمانیا تورانیکا به همراه لیشمانیا میجر در منطقه ترکمن صحرا می‌تواند این ایده را مطرح سازد که لیشمانیا میجر به‌عنوان عامل اصلی بیماری در انسان و لیشمانیا تورانیکا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]



نمودار شماره ۱: درخت فیلوژنتیکی ژن ITS-rDNA انوع لیشمانیا ثبت شده در بانک جهانی ژن و سکانس حاصل از دو لیشمانیا میجرو تورانیکا از فلبوتوموس پاپاتاسی از ترکمن صحرا با استفاده از آنالیز پارسیمونی و نرم افزار PAUP

به‌عنوان عامل ثانویه در ناقلین و مخازن بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی باشد. ممکن است گاها با تغییر ماهیت انگل لیشمانیا غیر بیماری‌زا از قبیل لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جربیلی در انسان نیز ایجاد بیماری نمایند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقایان احمد بقایی، علی بردبار، مهدی باغبان و خانم الناز علائی نوین از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور که در جمع‌آوری نمونه‌ها و کمک در کارهای آزمایشگاهی نقش شایانی داشتند تشکر می‌نمایند.

همچنین همکاری و هماهنگی‌های انجام شده توسط مسئولین و پرسنل محترم شبکه بهداشتی شهرهای گنبدکاووس و مراوه تپه موجب امتنان و سپاس نویسندگان بوده است. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتو پاستور ایران، طرح مصوب ۳۶۷ دکتر پرویز پرویزی تأمین گردیده است. قسمتی از نتایج این مقاله در راستای پایان نامه خانم مونا روشن قلب دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان بوده است که در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران تحت راهنمایی آقای دکتر پرویزی انجام پذیرفته است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

References

1. Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). Curr Opin Infect Dis 2009; 22(2): 126-130.
2. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med Vet Entomol 1990; 4(1): 1-24.
3. WHO. Initiative for vaccine research. 2011; Available from: http://www.who.int/vacci ne_ research/ diseases/ vector/ en/ index. html. Accessed September 8, 2011.
4. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(1): S1-S250.
5. Evans D. UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva: WHO; 1989; 1-45.
6. Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Zamen-Momeni. A Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. In: *Leishmania* parasite and leishmaniosis. 3rd ed. Tehran: Academic Press; 2008. p. 203-205 (Persian).
7. Hashemi SN, Mohebali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjaran H, Akhoundi B, et al. Comparison of leishmanin skin test and direct smear for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Acta Med Iran 2011; 49(3): 136-141.
8. Nadim A, Seyedi-Rashti M. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Med Iran 1971; 14(16): 99-106.
9. 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(5): 503-504.
10. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Kannani A. Host preference pattern of Phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran. Acta Trop 1995; 60(3): 155-158.
11. Nadim A, Seyedi-Rashti MA, Mesgali A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara Iran. J Trop Med Hyg 1968; 71(9): 238-239.
12. Javadian E, Mesghali A. Studies on cutaneous leishmaniasis in Khuzestan, Iran. Part I. The leptomonad infection of sandflies. Bull Soc Pathol Exot 1974; 67(5): 513-516.
13. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Seasonal variation of Leishmania major infection rates in sandflies from rodent burrows in Isfahan province. Iran Med Vet Entomol 1996; 10(2): 181-184.
14. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Schönian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop 2006; 98(1): 52-58.
15. Davami MH, Motazedian MH, Sarkari B. The changing profile of cutaneous leishmaniasis in a focus of the disease in Jahrom district, southern Iran. Ann Trop Med parasitol 2010; 104(5): 377-382.
16. Muller GC, Schlein Y. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of Phlebotomus papatasi. Ann Trop Med Parasitol 2011; 36(1): 64-70.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

17. Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, et al. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. Parasitol Res 2008; 103(6): 1273-1278.
18. 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(9): 1159-1171.
19. Nadim A, Mesghali A, Amini H. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran III. The vector. Trans R Soc Trap Med Hyg 1968; 62(4): 543-549.
20. Sudia WD, Chamberland RW. Battery operated light trap, an improved model. Mosquito News 1962; 22(13): 126-129.
21. 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; 93(1): 75-83.
22. 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(1): 41-49.
23. Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, AseVa A, et al. Leishmania (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR-RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. Exp Parasitol 2007; 115(4): 339-343.
24. Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) version 4.0. sinauer Associates, Snderland, Massachusetts.
25. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. Parasitol Res 2008; 103(5): 1159-1162.
26. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. A typical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8): 958-962.
27. 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(l): 186.
28. Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovsky EN, Dergacheva TI, Evans DA. Mixed Leishmania 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(8): 811-819.
29. Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Detection and isolation of Leishmania species in naturally infected Rhombomis opimus, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara, north east of Iran. Exp Parasitol 2011; 129(4): 375-380.
30. Hajjaran H, Mohebali M, Alimoradi S, Abaei MR, Edrissian GhH. Isolation and characterization of pathogenic Leishmania turanica from Nesokia indica (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103(11): 1177-1179.

31. Li-Ren G, Yuan-Qing Y, Jing-Qi Q, Wei-Xia S. Discovery and study of Leishmania turanica for the first time in China. Bull World Health Organ 1995; 73(5): 667-672.

32. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Exp Parasitol 2010; 126(4): 552-556.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]