

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

Mona Roshanghalb^{1,2},
Parviz Parvizi²

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).

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

مونا روشن قلب^۱

پرویز پرویزی^۲

چکیده

سابقه و هدف: بیماری لیثمانیوز یکی از بیماری مهم مناطق گرمسیری در جهان و ایران می باشد که علی رغم تلاش های گسترده برای ساخت واکسن تاکنون موفقیتی به همراه نداشته و دیگر روش های متداول کنترل نیز نتوانسته است از گسترش روز افزون بیماری بکاهد. لذا شناخت و تعیین هویت انگل لیثمانیا در ناقل با استفاده از روش های نوین مولکولی هدف اصلی تحقیق است، تا بتوان با تعیین هویت انگل و دیگر خصوصیات اکولوژی و بیولوژی ناقل، برای کنترل بیماری به صورت منطقه ای برنامه ریزی کرد.

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

یافته ها: از ۱۶۸ پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی صید شده، تعداد ۱۸ عدد دارای آلودگی لیثمانیایی با دو گونه انگل لیثمانیا 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 روش های نوین مولکولی، لیثمانیا میجر به عنوان عامل و فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقل اصلی لیثمانیوز جلدی روستایی در ایران و منطقه ترکمن صحرا مورد تأیید مجدد قرار گرفت. وجود لیثمانیا تورانیکا غیربیماری زا در فلبوتوموس پاپاتاسی و مخازن حیوانی، می تواند نقش این انگل را در دوام و پایداری سیکل بیماری مطرح سازد.

واژه های کلیدی: لیثمانیا میجر، لیثمانیا تورانیکا، فلبوتوموس پاپاتاسی، ITS-ribosomal DNA

مقدمه

انگلی با تظاهرات مختلفش قرار دارند (۲،۱). لیثمانیوز جلدی روستایی، ۸۰ درصد کل بیماری لیثمانیوز گزارش شده می باشد که ۹۰ درصد آن در کشورهای

لیثمانیوز جلدی بعد از تریپانوزوم آفریقایی، تب دانگ و مالاریا، بیماری مهم منتقله از ناقلین می باشد که در دنیا سالانه ۲ تا ۳۵۰ میلیون نفر در معرض این عفونت

E-mail: parp@pasteur.ac.ir

مؤلف مسئول: پرویز پرویزی - تهران: انستیتو پاستور ایران، گروه انگل شناسی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی

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

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) به جز منطقه‌ی جنوب شرقی آسیا، استرالیا و قطب جنوب اهمیت مطالعه بر روی لیشمانیوز جلدی را افزایش می‌دهد (۵،۳). انگل لیشمانیا میجر عامل، پشه خاکی فلbotomus پاپاتاسی^۱ و جوندگان گروه جریلیده مخازن اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران می‌باشند (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 لپتوموناد گزارش شده است؛ از جمله در پشه خاکی فلbotomus پاپاتاسی، گونه‌هایی از زیر جنس پارافلbotomus (شامل فلbotomus کوکازیکوس / فلbotomus مونگولنسیس)، فلbotomوس 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 می‌شود (۱۶،۱۵). آلودگی در پشه خاکی‌ها اغلب با تعداد کم انگل لیشمانیا همراه می‌باشد. روش ایزوآنزیم به‌عنوان روش استاندارد طلایی^۲ مطرح بوده است ولی اکنون ثابت شده است که روش‌های مولکولی در تشخیص آلودگی لیشمانیا حساس‌تر، اختصاصی‌تر و کم‌هزینه‌تر می‌باشد (۵، ۱۹-۱۷).

برای تعیین یک پشه خاکی به‌عنوان ناقل بیماری لیشمانیوز، پیدا کردن انگل به‌طور 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 (۲، ۱۹). 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 در آن‌ها به اتمام نمی‌رسد و شکل بیماری‌زای انگل در پشه خاکی کامل نمی‌گردد (۲، ۱۹). 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 به‌طور 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 (۶، ۷، ۱۵، ۱۹).

مواد و روش‌ها

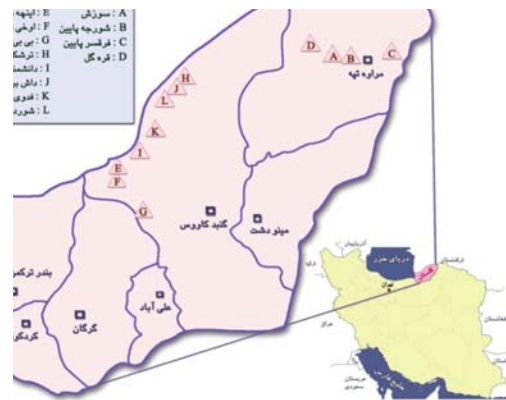
جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

پشه خاکی فلbotomus پاپاتاسی از مناطق مورد مطالعه، طی سه سال متوالی ۱۳۸۷-۱۳۸۹، در فصول فعالیت پشه خاکی‌های بالغ، با استفاده از تله چسبان^۳، تله نورانی CDC^۴ صید و جمع‌آوری شد. از تله چسبان برای صید فلbotomus پاپاتاسی در داخل خانه‌ها، اصطبل‌ها،

3. Sticky papers
4. Centers for Disease Control

1. Phlebotomus papatasi
2. Golden standard

مراکز نگهداری حیوانات خانگی، غارها و شکاف‌های طبیعی، داخل لانه‌ها و تونل‌های داخل زمین مختص موش‌های صحرائی 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 صحرائ 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 مונته 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، (forward) ITS1F با نوکلئوتیدهای (5'GCA GCT GGA TCA TTT TCC 3') و (reverse) ITS2R4 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 قراردادن ژن ITS-rDNA در فلبوتوموس پاپاتاسی، با تمرکز بر وضعیت شکمی، زیستگاه و روش‌های صید در روستاهای مورد مطالعه در منطقه ترکمن صحرا

| شهرستان | روستا | وضعیت شکمی پشه خاکی | | زیستگاه پشه خاکی | | روش‌های صید | تعداد کل فلبوتوموس پاپاتاسی به تفکیک روستا و موارد آلودگی لیشمانیایی | |
|--------------|-------|---------------------|--------|------------------|--------------|-------------|--|--------------|
| | | تازه خون خورده | باردار | نیمه باردار | لانه‌ی جوانه | | طولیه | اماکن انسانی |
| ترشکلی | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| دزاولوم فدوی | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| اینچه برون | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| اوخی تپه | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کالوس | | ۱۳ | ۱۰ | ۷ | ۶۳ (**/۱۱*) | ۰ | ۵۳ (**/۱۱*) | ۱۷ |
| دانشمند | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| بی بی شیروان | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| فرق سر پائین | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| سوزش | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| مرادیه تپه | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| شورجه پائین | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| قره گل | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| شوردگش | | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| جمع کل | | ۱۶۸ | ۱۶۸ | ۱۶۸ | ۱۶۸ | ۱۶۸ | ۱۶۸ | ۱۶۸ |

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

یافته‌ها

در مجموع ۱۶۸ پشه خاکی ماده فلپوتوموس پاپاتاسی از میان تعداد زیاد گونه‌های مختلف پشه خاکی صید شده از منطقه، از نظر موفولوژیکی شناسایی و تعیین گونه شد تا آلودگی لیثمانیایی 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 لیثمانیایی 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 لیثمانیایی تشخیص داده شده با *Nested PCR/ITS1-5.8S rRNA-ITS2*

ژن *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* انگل لیثمانیا که یک قطعه از ژن *ITS-rDNA* می‌باشد در پشه خاکی فلپوتوموس 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 فلپوتوموس پاپاتاسی، ۱۸ مورد آلودگی لیثمانیایی یافت شد.

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

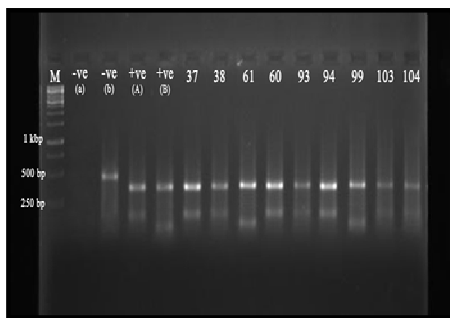
هضم محصولات *PCR* به روش *RFLP* و سکانس توالی‌ها تمام موارد مثبت محصولات *PCR* توسط آنزیم اندونوکلئاز *BsuRI* و با روش *RFLP* مورد هضم قرار گرفت. آنزیم‌های اندونوکلئازی که به آن‌ها آنزیم‌های محدودکننده (*Restriction Enzyme*) نیز می‌گویند، قادرند رشته *DNA* را در نواحی با توالی خاص بشکنند و لذا قطعات *DNA* بسته به نوع آنزیم به کار رفته و توالی *DNA* به قطعات مختلف با اندازه‌های متفاوت خرد می‌شوند. انتخاب آنزیم *BsuRI* در این تحقیق با آنالیز سکانس گونه‌های رفرانس لیثمانیا توسط نرم‌افزار *CLC DNA Workbench 5.2* صورت گرفت. پس از الکتروفورز این قطعات را می‌توان مشاهده و با یکدیگر مقایسه کرد. هر گونه از لیثمانیا 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 رفرانس 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™ 4.1.4* استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم‌افزار *PAUP* بهره گرفته شد (۲۵).

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

| تاریخ صید | استان گلستان - منطقه ی ترکمن صحرا | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|---------|-------------|------------|------------|--------------|---------|--------------|------|--------------|-------------|---------|
| | محل صید | | | | گنبد کاووس | | | | | | | |
| تاریخ جمع موارد به تفکیک | شوردگش | ترشکلی | دزولوم فدوی | اینچه برون | اوبخی تپه | دائلی برون | دانشمند | بی بی 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 φ/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 | ۱۶۸(۱۸) |

Leishmania turanica : ** *Leishmania major* :*

روش RFLP مورد هضم قرار گرفت و لیشمانیا تورانیکا تشخیص داده شد و نیز برای تعیین توالی ارسال گردید. برای هر دو نمونه سکانس ها و توالی ها با سکانس ها و توالی های به ثبت رسیده از ژن ITS1-ITS2 rRNA -5.8S 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 BsuRI 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 BsuRI، +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}

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

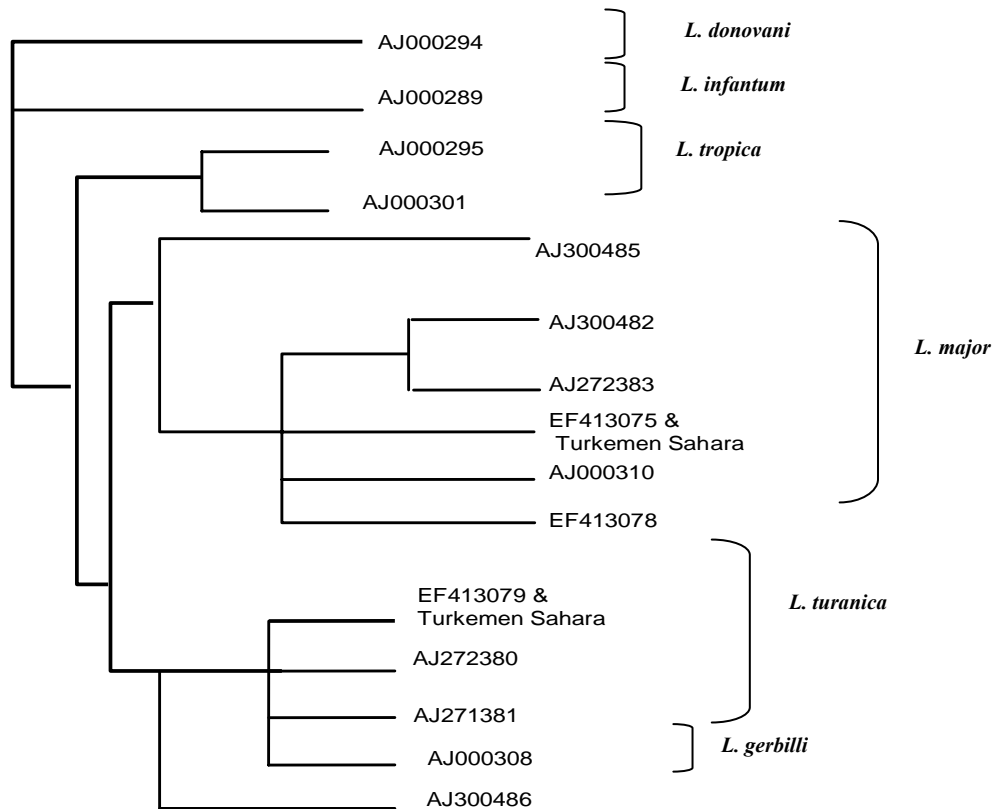
جهت تعیین هویت و گونه انگل لیشمانیا نتایج این تحقیق، محصولات PCR همه ۱۸ مورد مثبت آلودگی لیشمانیایی، توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت. ۱۶ مورد به طور قطع لیشمانیا میجر تشخیص داده شد (جدول شماره ۲). آنزیم BsuRI (HaeIII) که DNA را در ناحیه GGCC شناسایی کرده بود، جهت تأیید مجدد و تکمیل تعیین هویت انگل، ۸ نمونه از ۱۸ مورد محصول PCR ژن ITS1-5.8S rRNA -ITS2، تعیین توالی گردید که ۶ مورد با توالی های 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 لیشمانیایی توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با

بحث

دو انگل لیشمانیا میجر و لیشمانیا تورانیکا در پشه‌خاکی فلپوتوموس 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 (۲۶، ۲۷). در بسیاری از موارد گونه انگل بدون تایپ، لیشمانیا میجر و یا لیشمانیا تروپیکا گزارش گردیده است (۲۵، ۲۶). در گذشته تشخیص انگل لیشمانیا با روش‌های متداول آزمایشگاهی انجام می‌گرفت. 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 لیشمانیوز جلدی روستایی، جلدی شهری و لیشمانیوز احشایی اعلام می‌گردید (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 اندمیک لیشمانیا میجر، علاوه بر عامل اصلی بیماری، لیشمانیا تورانیکا، لیشمانیا جریلی و لیشمانیای جدید نزدیک به لیشمانیا جریلی از ناقلین (پشه‌خاکی‌ها) یا مخازن حیوانی (جونندگان) گزارش گردیده

است (۱۹، ۳۱، ۳۲). 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) در صد در صد مطابقت داشت. آنالیزهای انجام شده با نرم‌افزار Sequencher™ 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 (۱۸، ۲۹). 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 جریلی 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



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

همچنین همکاری و هماهنگی‌های انجام شده توسط مسئولین و پرسنل محترم شبکه بهداشتی شهرهای گنبد کاووس 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.

به‌عنوان عامل ثانویه در ناقلین و مخازن بیماری لیثمانیوز جلدی روستایی باشد. ممکن است گاهی با تغییر ماهیت انگل لیثمانیا غیر بیماری‌زا از قبیل لیثمانیا تورانیکا و لیثمانیا جریلی 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.

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 leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4(1): 1-24.
3. WHO. Initiative for vaccine research. 2011; Available from: http://www.who.int/vaccine_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, Mohebbali 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, Mohebbali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjarian H, Akhondi 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, Mohebbali 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 Turkmen 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 leptomonaad 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, Schönián 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.

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 Trop 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: comparison 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, Sunderland, 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, Fakhari 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 Turkmen Sahara area, Iran. *Parasitol Int* 1998; 47(1): 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 *Rhombomys opimus*, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara, north east of Iran. *Exp Parasitol* 2011; 129(4): 375-380.
30. Hajjarian 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

- 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.