

آلودگی طبیعی پشه خاکی‌های سرژانتومیا دنتاتا در منطقه اردبیل به لیشمانیای خزنده

ناصح ملکی^۱، عزت‌الدین جوادیان^۲، مهدی محبعلی^۳، عبدالحسین دلیمی اصل^۴، جاوید صدراپی^۵
ذبیح‌ا. زارعی^۶، محمدعلی عشاقی^{۷*}

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استادیار، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۶- کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۷- دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۶

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۹

چکیده

هدف: در این مطالعه حشره‌شناسی برای تعیین پشه خاکی‌های ناقل لیشمانیا، تعداد ۳۵۸ پشه خاکی متعلق به جنس سرژانتومیا در کانون بومی لیشمانیوز احشایی شمال غرب ایران بررسی شدند.
مواد و روش‌ها: DNA سینه و شکم پشه خاکی استخراج شد و آلودگی طبیعی آن‌ها به لپتوموناد به‌کمک روش semi-nested PCR و تعیین توالی بخشی از ژن *ITS-rDNA* مورد آزمایش قرار گرفت.
نتایج: نتایج نشان داد که دو نمونه پشه خاکی سرژانتومیا دنتاتا به انگل‌های لیشمانیای خزندگان متعلق به زیرجنس سارولیشمانیا آلوده بودند. آنالیز و مقایسه توالی DNA ژن مربوط با اطلاعات بانک جهانی ژن نشان داد که توالی آن ۷۶ درصد با لیشمانیا (سارولیشمانیا) آدلری مشابهت دارد. با این حال برای تعیین هویت نهایی آن‌ها باید مطالعات بیشتری صورت پذیرد. از نکات جالب توجه این‌که در این مطالعه یک عدد پشه خاکی گونه سرژانتومیا سینتونی از اماکن انسانی صید شد که از خون هموگلوبین‌دار میزبان پستاندار تغذیه کرده بود.
نتیجه‌گیری: زیرجنس سارولیشمانیا به‌علت فقدان فاکتور لیپوفسفوگلیکان توانایی ورود به سلول‌های فاگوسیت‌کننده را نداشته و برای انسان بیماری‌زا نیستند. گلیکوپروتئین فسفولیپید ساختاری است که در این نوع انگل‌ها وجود داشته و با سرم بیماران کالازاری، کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی ایجاد می‌نماید. به‌علت شباهت آنتی‌ژنیکی این نوع انگل‌ها و انگل‌های لیشمانیای آلوده‌کننده پستانداران، در بررسی‌های سرولوژیک امکان گزارش مثبت‌های کاذب کالازار وجود دارد. ناقل این نوع انگل‌ها جنس سرژانتومیا است که بعضی از زیرجنس‌های آن مانند سینتونیوس مشخصات حدواسط جنس فلبوتوموس را نشان می‌دهند. بعضی از گونه‌های این زیرجنس، قادر به گزش انسان هستند. این نخستین گزارش از خونخواری سرژانتومیایا از پستانداران و حضور انگل مشابه لیشمانیا (سارولیشمانیا) آدلری در ایران است.
کلیدواژگان: لیشمانیا (سارولیشمانیا) آدلری، لیشمانیا خزندگان، پشه خاکی، ایران.

۱- مقدمه

انگل‌های لیشمانیا (*Leishmania*)، از تک یاخته‌های ایجادکننده بیماری لیشمانیوز (*Leishmaniose*) در انسان و جمعیت‌های مختلف حیوانات محسوب می‌شوند [۱]. تاکنون بیش از ۳۰ گونه از انگل‌های جنس لیشمانیا شناسایی شده‌اند

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه حشره‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶
Email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

توالی‌های DNA نشان داده است که این زیرجنس از گروه‌های ثانویه گونه‌های آلوده‌کننده پستانداران هستند [۵، ۱۴-۱۶]. برخلاف سایر لیشمانیاها در مورد این گروه مطالعات کمتری انجام شده است. چرخه تکاملی آن‌ها به صورت زیر درجچه پیلور است. البته ادعاهایی مبنی بر تکامل آن‌ها در بخش‌های جلوتر معده میانی پشه خاکی نیز وجود دارد [۱۷، ۱۸]. ناقل این انگل‌ها پشه خاکی‌های جنس سرژتومیا (*Sergentomyia*) هستند که اغلب در دنیای قدیم پراکنده بوده و روی خزندگان تغذیه می‌نمایند [۹، ۱۰]. مانند سایر لیشمانیاها پروماستیگوت‌ها به همراه خون خورده شده در داخل پرده دور غذا (Peritrophic Matrix) به دام می‌افتند. در سرژتومیا برخلاف فلپتوموس (*Phlebotomus*) و لوتزومیا (*Lutzomyia*) «پرده دور غذای» ضخیم‌تری ایجاد می‌شود که ممکن است یکی از دلایل عدم تکامل این انگل‌ها در قسمت جلویی معده میانی باشد [۱۹، ۲۰] و به همین علت انگل‌ها به معده عقبی رانده می‌شوند و احتمالاً مکانیزم انتقال آن‌ها از طریق دفع انگل در حین خونخواری است که در محل زخم، شکاف جلد یا سطوح مخاطی (به علت مالش جلد آلوده به آن‌ها) صورت می‌گیرد. پدیده پیش از دفع (*Prediuressis*) که در حین تغذیه روی میزبان به‌منظور تغلیظ خون خورده شده روی می‌دهد، مکانیزم انتقال از طریق دفع را تسهیل می‌نماید [۲۱]. تصور عمومی در انتقال این انگل‌ها به این صورت است که تغذیه خزندگان از پشه خاکی‌های آلوده باعث انتقال آن‌ها می‌شود [۲۲]. پشه خاکی‌ها نیز انگل‌ها را در حین گردش مخاط سطحی دستگاه گوارش خزندگان دریافت می‌نمایند [۲۱].

روش‌های تشخیصی مختلفی مانند روش کشت انگل، تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی، بررسی میکروسکوپی، بررسی سرولوژیکی مبتنی بر جستجوی آنتی‌بادی‌ها، تشخیص از طریق ناقل استریل (*Xenodiagnosis*) و در نهایت روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای تشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی انگل وجود دارد. از بین این موارد دو روش کلاسیک، برای تخمین میزان آلودگی میزبان، مخزن و حشرات ناقل به کار می‌روند که شامل بررسی‌های میکروسکوپی و جداسازی انگل از طریق کشت هستند. هر دوی این روش‌ها

که حدود ۲۰ گونه آن اهمیت پزشکی و دامپزشکی دارند. انگل‌های لیشمانیا سه نوع بیماری جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی را در انسان ایجاد می‌نمایند و تنها راه انتقال قطعی بیماری، گزش پشه خاکی‌های فلپتومینه (*Phlebotomine sandflies*) آلوده است [۲]. تاکنون ۷۰۰ گونه فلپتومینه شناسایی شده که تنها ۱۰ درصد آن‌ها توانایی انتقال ۳۰ گونه انگل را دارند [۳]. براساس محل تکامل انگل‌های لیشمانیا در معده پشه خاکی ناقل، سه زیرجنس مختلف لیشمانیا، ویانیا (*Viannia*) و سارولیشمانیا (*Sauroleishmania*) شناسایی شده [۴] که این تقسیم‌بندی بعداً براساس فیلوژنی توالی‌های DNA مورد تأیید قرار گرفته است [۲، ۵، ۶]. پشه خاکی‌های ماده انگل‌های لیشمانیا را در حین خونخواری می‌بلعند و با تغییر شرایط محیطی از جمله کاهش دما و افزایش pH آماسیتیگوت (*Amastigote*) به پروماستیگوت (*Promastigote*) تبدیل می‌شود [۲، ۷]. این تغییر و تبدیل در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش پشه خاکی ناقل صورت می‌گیرد که در زیرجنس‌های لیشمانیا، ویانیا و سارولیشمانیا به ترتیب در بالای درجچه پیلور (*Suprappylarian*) بالا و پایین درجچه پیلور (*Peripylarian*) و زیر درجچه پیلور (*Hypopylarian*) انجام می‌شود. سارولیشمانیا زیرجنسی از لیشمانیا است که برای انسان بیماری‌زا نبوده و به عنوان لیشمانیوز مارمولک (*Lizard Leishmaniasis*) شناخته شده است [۸]. تا به حال چندین گونه از لیشمانیای خزندگان مانند لیشمانیا داویدی (*L. davidi*)، لیشمانیا پروماستیگوت (*L. promastigotae*)، لیشمانیا آدلری (*L. adleri*)، لیشمانیا تارنتولا (*L. tarentolae*)، لیشمانیا چاملئونیس (*L. chameleonis*) و لیشمانیا هنریسی (*L. henrici*) در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است [۹]. در کشور ایران نیز گونه لیشمانیا پروماستیگوت گزارش شده است [۹-۱۲]. لیشمانیا آدلری برای اولین بار در کنیا از مارمولک لاتاستیا لانگیکاداتا (*Latastia longicadata*) جدا و نامگذاری شد [۱۳].

قبلاً این زیرگونه وضعیت تاکسونومیکی مشخصی نداشت و گاهی در داخل و گاهی خارج جنس لیشمانیا و گاهی نیز به‌عنوان اجداد جنس لیشمانیا و به صورت گروه اولیه (*Primitive Group*) شناخته می‌شد. مطالعات اخیر بر مبنای

اقدام شد. هر روز قبل از غروب آفتاب تعداد ۱۵۰-۲۰۰ تله چسبان در اماکن داخلی انسانی (مانند اتاق‌ها، دستشویی، حمام و آشپزخانه)، داخلی حیوانی (طویله، اماکن نگهداری حیوانات، لانه پرندگان و لانه سگ)، خارجی انسانی (زیر پل، درز و شکاف سنگ‌ها در حاشیه جاده‌ها، حیاط منازل، محل‌های مخروبه خالی از سکنه) و طبیعی (لانه سگ‌سانان مانند گرگ و روباه و شغال حاشیه رودخانه‌ها و درز و شکاف تنه درختان) نصب و فردای آن روز قبل از طلوع آفتاب تله‌ها جمع‌آوری می‌شد. نمونه‌های صیدشده به کمک سوزن انسولین از روی تله‌ها جدا و بعد از سه بار شستشو با الکل مطلق در یخچال کنسرو می‌شد. در آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی قسمت سر و سه بند انتهایی شکم برای شناسایی ریخت‌شناسی با محلول پوری (Pori)، مونته می‌شد. قسمت میانی شکم نیز در لوله‌های اپندورف (Eppendorf) ۰/۷ میلی‌لیتر تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. شناسایی نمونه‌های مونته شده با استفاده از کلید تشخیص تودور- متقالی انجام شد [۲۲].

۲-۳- استخراج DNA و PCR

استخراج DNA از قسمت میانی بدن پشه خاکی‌ها با روش توصیف شده توسط آرانسای (Aransay) (۱۹۹۹) با کمی تغییرات انجام گرفت [۲۵]. DNA استخراج شده در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل یا بافر TE (Tris-EDTA) حل و در دمای یخچال نگهداری شد. از روش Semi-nested PCR برای جستجوی حلقه‌های کوچک DNA کیتوپلاست (kDNA Minicircle) برای تعیین آلودگی لپتومونادی در پشه خاکی‌ها استفاده شد. به‌لحاظ فراوانی حلقه‌های کوچک موجود در DNA کیتوپلاستی (kDNA)، بررسی اولیه آلودگی پشه خاکی‌ها با استفاده از این قسمت از ژنوم بسیار آسان و کارآمد است.

در واکنش Semi-nested PCR، در مرحله اول از آغازگر (Primer) جلووی (LINR4 (Forward) 5'-GGGGTTGGTGTAAATAGGG-3') و آغازگر برگشتی (LIN17 (Reverse) 5'-TTTGAACGGGATTCTG-3') و در مرحله دوم فقط از آغازگر برگشتی (LIN19 5'-CAGAACGCCCTACCG-3') استفاده شد. در مرحله اول واکنش در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر بافر Taq 1X پلیمرز، ۱ واحد Taq (Unit) پلیمرز، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرومولار dNTPs، ۱ میکرومول

روش‌های سخت، طولانی مدت، زمان‌بر و غیردقیق هستند و در صورت کم بودن تعداد انگل، احتمال منفی کاذب زیاد است. از طرف دیگر به‌لحاظ شباهت ریخت‌شناختی گونه‌ها و زیرگونه‌ها، ارزش تشخیصی این دو روش پایین بوده و بایستی از سایر مطالعات تکمیلی مانند تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی، مطالعات ایزوآنزیمی یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای تعیین گونه و زیرگونه‌های انگل جداسازی شده استفاده شود [۲۴، ۲۳].

این مطالعه به‌منظور بررسی آلودگی لپتومونادی (Leptomonad) پشه خاکی‌های کانون بومی لیشمانیوز احشایی شمال غرب کشور (منطقه گرمی) و پیش‌بینی رویدادهای احتمالی مرتبط با بیماری کالاآزار (Kala-azar) در سال ۸۶-۱۳۸۵ طراحی و اجرا شده است. این مطالعه که در نوع خود برای اولین بار انجام می‌شود ارتباط انگل‌های آلوده‌کننده خزندگان با انگل‌های لیشمانیای آلوده‌کننده پستانداران را مورد بررسی قرار می‌دهد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- منطقه مورد مطالعه

این مطالعه در شهرستان گرمی استان اردبیل، یکی از مهم‌ترین کانون‌های لیشمانیوز احشایی ایران انجام شده است. شهرستان گرمی یکی از ۱۰ شهرستان استان اردبیل است که بعد از مشکین‌شهر بیشترین موارد لیشمانیوز احشایی در آنجا رخ می‌دهد. شرایط اقلیمی منطقه به‌صورت مدیترانه‌ای بوده با این تفاوت که دارای وزش بادهای موسمی به‌نام بادهای خزری است که باعث افزایش دما می‌شود. در این مطالعه ۶ روستا از نظر آلودگی لپتومونادی بررسی شد که سه روستای کلاسرا، شاه‌تپه‌سی و حمزه‌خانلو به‌عنوان ایستگاه ثابت و سه روستای حسی‌کندی، قاسم‌کندی و سروآغاجی به‌عنوان ایستگاه متغیر در نظر گرفته شدند.

۲-۲- جمع‌آوری، تشریح و شناسایی ریخت‌شناختی

پشه خاکی‌ها

در این مطالعه در فصل فعالیت پشه خاکی‌ها، از انتهای فصل بهار (خرداد) تا اوایل فصل پاییز (ابتدای مهر ماه)، با استفاده از تله چسبان (کاغذ سفید آغشته به روغن کرچک) به صید نمونه‌ها

۶۰ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۱ میلی‌مولار از هر آغازگر، ۱ واحد *Taq* پلیمرز و ۱ میکرولیتر از DNA نمونه استفاده شد. بعد از اتمام واکنش محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

۲-۵- تعیین توالی نمونه‌ها

محصول PCR ژن ITS نمونه‌های مثبت شده به میزان تقریبی ۱۰۰ میکرولیتر تکثیر و برای تعیین توالی به کشور آلمان ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی اصلاح و با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن و به کمک نرم‌افزار Blast (www.ncbi.nih.gov/blast) مقایسه شدند [۲۷].

۳- نتایج

در مطالعه بررسی ناقلین کالآزار در منطقه گرمی استان اردبیل، در مجموع ۳۴۴۷ پشه خاکی بررسی شد که از این تعداد ۲۹۲۰ عدد پشه خاکی جنس فلبتوموس و ۵۲۷ عدد جنس سرژنتومیا تشخیص داده شد. از ۵۲۷ پشه خاکی متعلق به جنس سرژنتومیا، ۱۶۹ نمونه آن نر و ۳۵۸ نمونه آن ماده بودند (جدول ۱). نتایج مطالعه ریخت‌شناسی سرژنتومیایا بیانگر حضور سه گونه سرژنتومیا دنتاتا (*S. dentate*)، سرژنتومیا سیتونی (*S. sintoni*) و سرژنتومیا پاولوسکی (*S. powlowsky*) در منطقه است. جزییات بیشتر نمونه‌های صیدشده در جدول ۱ آمده است. از مجموع ۳۵۸ پشه خاکی ماده بررسی شده دو نمونه در بررسی کیتوپلاست مثبت شد که ناقل هر دو لپتوموناد سرژنتومیا دنتاتا شناسایی شد. یکی از این پشه خاکی‌ها از اماکن طبیعی روستای حس‌کندی و دیگری از اماکن طبیعی روستای حمزه‌خانلو صید شده بود.

برای تعیین هویت انگل‌ها در هر دو نمونه ژن rDNA با موفقیت تکثیر و برای تعیین توالی به کشور آلمان ارسال شد. یکی از نمونه‌ها با موفقیت تعیین توالی شد و نتایج توالی حاصل با نرم‌افزار Blast [۲۷] بررسی و مشخص شد که نمونه مورد مطالعه از گروه لیشمانیای خزندگان بوده که تا حدود ۷۶ درصد به گونه لیشمانیا (سارولیشمانیا) آدلری شباهت دارد. توالی بخش ITS2 نمونه بررسی شده در این مطالعه، با شماره دسترسی EU637914 در بانک جهانی ژن ثبت شد.

LIN4 و ۰/۲ میکرومول LIN17 و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده استفاده شد. چرخه حرارتی مرحله اول واکنش به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۱۷ چرخه متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه است که بعد از اتمام چرخه‌ها در نهایت واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تداوم یافت. مرحله دوم واکنش در حجم کلی ۹۰ میکرولیتر شامل مقادیر اشاره شده از *Taq*، $MgCl_2$ ، dNTPs، همچنین ۱ میکرومول از آغازگر LIN19 و در شرایط دمایی ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه که با ۳۳ بار تکرار و نگهداری نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام واکنش ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد.

۲-۴- تکثیر rDNA در نمونه‌های مثبت شده

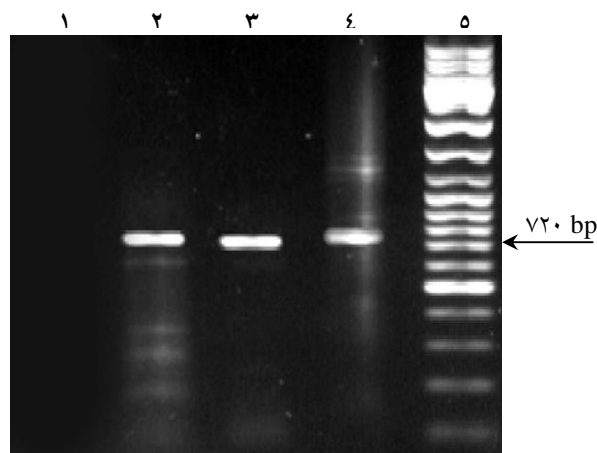
به‌لحاظ تنوع ژنتیکی حلقه‌های کوچک kDNA لیشمانیا، تعیین هویت نمونه‌ها براساس تعیین توالی این بخش از ژنوم قابل اعتماد نبوده و عملاً امکان تعیین توالی بسیار سخت و مشکل است. بنابراین برای تعیین هویت نهایی از ژن rDNA (ribosomal DNA) استفاده می‌شود. ژن rDNA یا rRNA (ribosomal RNA) بین دو زیرواحد بزرگ و کوچک ریبوزوم واقع شده و در نسل‌های متوالی با کمترین تغییری به ارث می‌رسد. در این مطالعه برای تعیین هویت نمونه‌هایی که به‌طریق kDNA مثبت می‌شدند از فضای بین‌بخشی نسخه‌برداری‌شونده (Internal Transcribed Spacer: ITS) این ژن استفاده شد. در این واکنش از دو آغازگر IR1 و IR2 که برای اولین بار توسط کپولیلو (Cupolillo) (۱۹۹۵) معرفی شد استفاده گردید [۲۶]. توالی آغازگر جلویی IR1 به صورت 5'-GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA (3'-GCT GGA TC) و آغازگر برگشتی IR2 به صورت 5'-GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA (3'-GGT CTG) است. در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر از واکنش بافر ۱X *Taq* پلیمرز، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ،

جدول ۱ مشخصات نمونه‌های مختلف پشه خاکی‌های جنس سرژنتومیا صیدشده در منطقه گرمی استان اردبیل از لحاظ گونه، اماکن صید و وفور

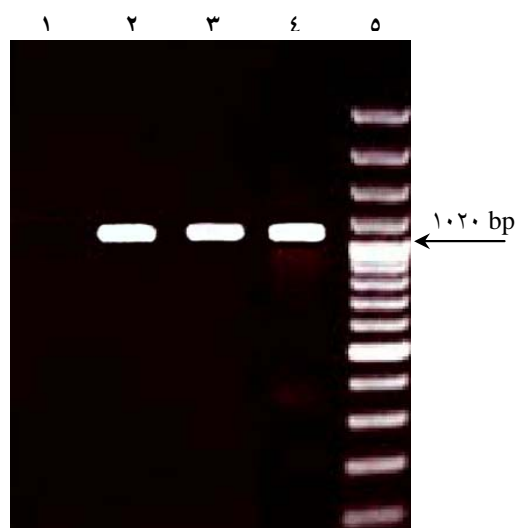
جمع کل	ماده					نر					گونه
	اماکن					اماکن					
	جمع	طبیعی	دست‌ساز	انسانی	حیوانی	جمع	طبیعی	دست‌ساز	انسانی	حیوانی	
۳۴۰	۳۱۳	۲۰۱	۶۳	۳۱	۱۸	۲۷	۲۶	۱	-	-	سرژنتومیا دناتا
۱۸۶	۴۴	۵	۸	۱۱	۲۰	۱۴۲	۸۹	۱۵	۱۴	۲۴	سرژنتومیا سیتونی
۱	۱	-	۱	-	-	-	-	-	-	-	سرژنتومیا پاولوسکی
۵۲۷	۳۵۸	۲۰۶	۷۲	۴۲	۳۸	۱۶۹	۱۱۵	۱۶	۱۴	۲۴	جمع

۴- بحث

لیشمانیوز مارمولک که در بین بعضی از انواع مارمولک‌ها دیده می‌شود به هیچ وجه به انسان سرایت نمی‌کند. عامل این بیماری در زیرجنس سارولیشمانیا که از منسوبین جنس لیشمانیا است، قرار دارد. این انگل‌ها از طریق بلع و له شدن پشه خاکی‌های آلوده به مارمولک‌ها انتقال می‌یابند. در ایران مارمولک‌های آلوده از خراسان، خوزستان و منجیل صید شده‌اند. در خراسان مارمولک‌های آگاما ملانورا (*Agama melanoura*) و آگاما آگیلیس (*A. agilis*) به انگل آلوده بوده‌اند که از طریق کشت خون قلب در محیط کشت NNN (Novy-Nicolle-McNeal) انگل تکثیر پیدا کرده ولی در اسلایدهای میکروسکوپی نمونه‌ای مشاهده نشده است. در منجیل از مارمولک آلوده آگاما کوکاسیکا (*A. caucasica*)، انگل هم به طریق تشریح اندام‌های داخلی و هم مشاهده میکروسکوپی ثبت شده است. در اتحاد جماهیر شوروی سابق نیز آلودگی ژیمنوداکتیلوس کاسپیکوس (*Gymnodactylus caspicus*) به انگل خزندگان در بیش از ۲۰ درصد نمونه‌ها گزارش شده است [۲۹، ۲۸]. ناقل اصلی این بیماری سرژنتومیا سیتونی است که از لانه مارمولک‌های آلوده خراسان صید شده است. در ترکمن صحرا، لطف‌آباد و خوزستان سرژنتومیا سیتونی صید شده، آلودگی لپتومونادی بیشتری نشان داده است. خون معده این پشه خاکی‌ها حاوی گلبول‌های هسته‌دار گزارش شده که بیانگر تغذیه از مارمولک است [۱۰، ۱۱، ۳۰]. در ایران آلودگی طبیعی علاوه بر سرژنتومیا سیتونی از سرژنتومیا کلایدی (*S. clydei*) و



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر بخش حلقه‌های کوچک kDNA. ستون ۱: کنترل منفی (پشه خاکی نر)؛ ستون‌های ۲ و ۳: نمونه‌های پشه خاکی ماده مثبت شده؛ ستون ۴: کنترل مثبت (انگل لیشمانیا ماژور)؛ ستون ۵: نشانگر (Marker).



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر بخش IIS-tDNA. ستون ۱: کنترل منفی (پشه خاکی نر)؛ ستون‌های ۲ و ۳: نمونه‌های پشه خاکی ماده مثبت شده؛ ستون ۴: کنترل مثبت (انگل لیشمانیا ماژور)؛ ستون ۵: نشانگر.

علت زیرجنس سارولیشمانیا را برای این انگل‌ها پیشنهاد نمودند [۳۳،۳۲]. انگل‌های مارمولک ارگانسیم‌های مفیدی در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و بیوشیمی جنس لیشمانیا هستند چرا که در آزمایشگاه بدون هیچ خطری به‌راحتی نگهداری می‌شوند [۱۴،۳۲]. واکنش مقاطع آنتی‌ژنی بین لیشمانیا آدلری و لیشمانیا دونووانی گزارش شده [۱۷] که شاید از طریق حضور عمومی جزء چهارم GIPL قابل توضیح باشد. چرا که این ساختار با آنتی‌بادی‌های سرم بیماران کالآزاری کمپلکس قوی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را تشکیل می‌دهد [۳۴]. لیشمانیا آدلری و لیشمانیا تارتولا به‌علت فقدان LPG (که بقای انگل در داخل ماکروفاژ را تضمین می‌کند) از لحاظ چرخه زندگی، تفاوت معنی‌داری با انگل‌های لیشمانیای پستانداران نشان می‌دهند [۳۵] و به‌همین علت هم اغلب به شکل خارج سلولی دیده می‌شوند. در مطالعه دیگر به‌منظور بررسی بازدارنده‌های ورود پروماستیگوت‌های لیشمانیا دونووانی به ماکروفاژ از دو گلیکوکانژوگه (لیگاند گلیکوپروتئین فوکوز مانوز و لیگاند فسفات مانوگالاکتان) استفاده شده بود که در این مطالعه از پروماستیگوت‌های لیشمانیا آدلری به‌عنوان شاهد منفی استفاده شده بود [۳۶].

لیشمانیا تارتولا به‌عنوان یک واکنس زنده می‌تواند در برابر لیشمانیا (لیشمانیا) دونووانی ایمنی‌زا باشد. بنابراین مسیر جدیدی در ابداع واکنس‌های غیربیماری‌زا در برابر لیشمانیوز احشایی باز شده است [۵]. لیشمانیاهای مارمولک نقش مهمی در اپیدمیولوژی لیشمانیا دارد. در یک مطالعه پروماستیگوت‌های لیشمانیا آدلری به داوطلبان تزریق و پنج روز بعد آماستیگوت‌های انگل بررسی شده است. کاظمی و همکاران طی مطالعات مختلف موفق شدند قدرت ایمنی‌زایی اجزای پروتئینی لیشمانیای خزندگان در برابر لیشمانیا ماژور را در موش‌های Balb/C نشان دهند [۳۷، ۳۸]. این محققین نشان دادند که روی بدن موش‌های مورد آزمایش که قبلاً پروتئین لیشمانیای خزنده دریافت کرده بودند پس از دریافت لیشمانیا ماژور هیچ‌گونه زخمی ایجاد نشد. مطالعات دیگری نیز نشان داده است که بین لیشمانیاهای هوگسترالی و آدلری و گونه‌های ایجادکننده لیشمانیوز در پستانداران شباهت آنتی‌ژنیکی وجود دارد، بنابراین مثبت‌های کاذب در بیماری کالآزار احتمالاً به علت حضور این انگل‌ها است [۳۹، ۲۵].

سرژنتومیا دنتاتا نیز گزارش شده است. گونه اول از تمام کانون‌های آلوده، گونه دوم از لطف‌آباد و گونه اخیر نیز از مشکین‌شهر گزارش شده است [۳۱]. سیدی‌رشتی (Seyedi Rashti) و همکاران لیشمانیا (سارولیشمانیا) ژیمنوداکتیلی (*L. (Sa.) gymnodactyli*) را به‌عنوان عامل بیماری از ایران معرفی کرده‌اند [۳۰].

جنس سرژنتومیا وضعیت چندان مشخصی ندارد. بعضی از زیرجنس‌های آن مانند سیتونیوس (*Sintonius*) مشخصات حدواسط جنس فلبتوموس را نشان می‌دهند. در عوض پیوستگی خیلی زیادی با لوزومیا‌های دنیای جدید دارند. در شرق آفریقا سرژنتومیا گارنهامی (*S. garnhami*) همانند گونه‌های فلبتوموس انسان را مورد گزش قرار می‌دهد ولی هیچ‌گونه عامل بیماری‌زایی را منتقل نمی‌نماید. بعضی از گونه‌های زیرجنس سیتونیوس هم قادر به گزش انسان هستند [۳]. سرژنتومیا کلایدی که حریرانه روی مارمولک خونخواری می‌کند ناقل لیشمانیا هوگسترالی (*L. hoogstraali*) است. همچنین سرژنتومیا کلایدی ناقل لیشمانیا آدلری در مارمولک‌ها و از طرف دیگر قادر به گزش انسان نیز است. بنابراین احتمال آلودگی انسان با لیشمانیا آدلری وجود دارد. آلودگی گذرای این انگل در انسان یک حساسیت تأخیری ایجاد و با تولید یک ایمنی نسبی، انسان را در برابر آلودگی با لیشمانیا دونووانی (*L. donavani*) محافظت می‌نماید [۲۹].

لیشمانیا آدلری گلیکوپلیپیدهای فسفولیپیدی (Glycoinositol Phospholipids: GIPLs) مشابه با لیشمانیای پستانداران دارد که ۴ جزء اصلی آن‌ها شناسایی شده است. براساس این چهار GIPL ارتباط فیلوژنیکی نزدیکی، بین لیشمانیاهای پستانداران و مارمولک برقرار می‌شود. با این حال برخلاف انگل‌های پستانداران که گلیکوکانژوگه‌های سطحی مانند لیپوفسفوگلیکان (*Lipophosphoglycan: LPG*) در آن‌ها به‌وفور یافت می‌شود در لیشمانیا آدلری مولکول‌های LPG وجود نداشته یا به مقدار خیلی کمتری وجود دارد. مرحله پروماستیگوت انگل‌های مارمولک از لحاظ ریخت‌شناختی شبیه انگل‌های پستانداران است و در هر دو گروه طی مکانیزم خونخواری منتقل می‌شوند. با این حال مرحله آماستیگوت لیشمانیوز مارمولک به‌ندرت مشاهده شده و تکثیر آن در سلول‌های بیگانه‌خوار مانند مشاهدات آزمایشگاهی نیست. به‌همین

۵- منابع

- [1] Bates PA, Ashford RW. Old World leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD. (Eds.), Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, tenth 10th ed. Parasitology, Hodder Arnold, London 2006; 283-312.
- [2] Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med.* 2004; 4: 601-9
- [3] Lane R P. Sandflies (Phlebotominae). In: Lane, R P(ed.) and Crosskey R W(ed.). *Medical Insects and Arachnids.* Chapman & hall, London, 1993; 78-109.
- [4] Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Leishmania in phlebotomid sand flies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc Roy Soc Lond B. Biol Sci* 1977; 199: 309-20.
- [5] Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 89(2): 149-59.
- [6] Telford Jr SR, The Kinetoplastid hemoflagellates of reptiles. In JP Kreier *Parasitic Protozoa*, Vol. 10, 2nd ed., New York, Academic Press, New York, 1995; 161-223.
- [7] Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22: 439-45.
- [8] Belova EM. Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bul World Org* 1971; 44: 553-60.
- [9] Kazemi B, Tahvildari Gh, Feshareki SR, Javadian E. Isolation a lizard leishmania promastigote from its natural host in Iran. *J Biol Sci* 2004; 4: 620-3.
- [10] Javadian E, Nadim A. Studies on cutaneous leishmaniasis n Khuzestan province, Iran, part I, The leptomonad infection of sandflies. *Bull Soc Path Exot* 1974; 67: 513-516.
- [11] Nadim A, Seyedi Rashti MA, and Mesghali A. On the nature of leptomonad found in *Sergentomya sintoni* in Khorassan, Iran and their relation to Lizard leishmaniasis. *J Trop Med Hyg* 1968; 71(9): 240.
- [12] Tahvildar-Bideroni F. Current status of *Leishmania* in Bakran region of Shahroud. M.Sc Thesis. School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Iran.
- [13] HEISCH RB. On the *Leishmania adleri*. *Spssp. Novnov.* from Lacertid lacertid lizard (*Latastia* sp) in Kenya. *Ann Trop Med Parasit* 1958; 52(1): 63-71.
- [14] Noyes HA, Arana BA, Chance ML, Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44(5): 511-17.
- [15] Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G, Dedet JP. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* spss. *Parasitology* 2002; 124: 17-24.
- [16] Orlando TC, Rubio MAT, Sturm NR, Campbell DA, Floeter-Winter LM. Intergenic and external

- transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(5): 695–701.
- [17] Wilson VCLC, Southgate BA, Lizard *Leishmania*. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the kinetoplastida*, vol. 2. Academic Press, London, 1979; 241–68.
- [18] Zhang LM, Leng YJ. Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915–1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China. *Parasite* 1997; 4(4): 299–306.
- [19] Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31–43.
- [20] Shatova SM, Safianova VM, Ovezmukhammadov A. [An experimental study of the interrelations of *Leishmania* (*Sauroleishmania*) *gymnodactyli* and the sandfly *Sergentomyia arpaklensis* (Diptera: Phlebotominae)]. *Parazitologiya*. 1991; 25: (2): 110–5.
- [21] Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *International Journal for Parasitology* 2007; 37: 1097–106.
- [22] Theodor O, Mesghali. On the Phlebotomine of Iran. 1964; *J Med Entomol*. 1964; 285–300.
- [23] Adini I, Jacobson RL, Kasp M, Schlein Y, Jaffe CL. Species-Specific Detection of *Leishmania* in Sand Flies Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 1998; (92(1): 35–7.
- [24] Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias EDES. Assessment of PCR in the Detection of *Leishmania* spp in Experimentally Infected Individual Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44(5): 255–9.
- [25] 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. *Apl Env Mic* 2000; 66(5): 1933–8.
- [26] Cupolillo E, Grimaldi JrG, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 145–55.
- [27] <http://www.ncbi.nih.gov/blast>
- [28] Bray RS. *Leishmania*. *Ann Rev Microbiol* 1974; 28: 189–217.
- [29] Lewis DJ, Ward RD. Transmission and vectors. In: *the leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters W(ed.) Killick-Kendrick R (ed.) vol.1, Orlando: Academic Press 1987; 235–62.
- [30] Seyedi Rashti MA, Agh-Atabay, Mohebbali M. Natural promastigote infection of *Sergentomyia sintoni* its seasonal variation and reservoir host in Tukmen Sahra IRAN. *Tehran Univ Med Sci Public* 1994; 23(1–4): 41–50.
- [31] Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidruni GH. Natural promastigote infection of sand flies and its first occurrence in *Sergentomyia dentata* in Ardebil province, northwest of Iran. *Ir J Publ Hlth*. 1997; 26 (1–2): 7–12.

- [32] Safjanova VM. The problem of taxonomy with *Leishmania*. Ser Protozool Sov Acad Sci Leningr 1982; 7: 5-109.
- [33] Shaw JJ. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. Braz J Genet 1997; 20: 123-8.
- [34] Sevlever D, Pahlsson P, Rosen G, Nilsson B, Londner MV. Structural analysis of a glycosylphosphatidylinositol glycolipid of *Leishmania donovani*. Glycoconj J 1991; 8(4): 321-9.
- [35] Previato JO, Jones C, Wait R, Routier F, Saraiva E, Mendonga-Previato L. *Leishmania adleri*, a lizard parasite, expresses structurally similar glycoinositolphospholipids to mammalian *Leishmania*. Glycobiology 1997; (7) (5): 687-95.
- [36] Palatnik CB, Previato PAJO, Gorin PA, Mendonga-Previato L. *Leptomonas samueli* glycoconjugates. Comparison with *Herpetomonas samuelpessoai*. Comp Biochem Physiol 1987; 86(3): 593-9.
- [37] Kazemi B, Moazzen F, Abadi AR, & Ghadjari A. Fractionation of Lizard *Leishmania* promastigote Protein. Pakistan J Biol Sci 2004; 7: 1703-5.
- [38] Kazemi B, Moazzen F, Abadi AR, Ghadjari A, Bandehpour M, Seyed N. Immunization of Balb/C mice by protein fragment of Lizard *Leishmania* promastigote. Pakistan J Biol Sci 2004; 7: 1699-1702.
- [39] Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M, Papadopoulou B. Live nonpathogenic parasitic-vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. Infect Immun 2005; 73: 6372-82.