

شناسایی و تعیین هویت گونه‌های لیشمانیای جدا شده از پشه خاکی‌ها با استفاده از سه جایگاه کینتوپلاست (kDNA)، ریبوزومال (rDNA) و سیستمین پروتئاز B (CPB)

ناصر ملک‌راواسان^۱، محمدعلی عشاقی^{۲*}، عزت‌الدین جوادیان^۳، یاور راثی^۴، مهدی محبعلی^۵، جاوید صدراپی^۶، ذبیح‌آ.. زارعی^۷، فاطمه محترمی^۸

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

تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱

چکیده

هدف: امروزه از اپیدمیولوژی مولکولی در تحقیقات مختلف اپیدمیولوژیکی بیماری لیشمانیوز احشایی از جمله تعیین ناقلین بیماری استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از سه جایگاه کینتوپلاست DNA، بخش‌های غیرقابل ترجمه ژن‌های ریبوزوم و ژن سیستمین پروتئاز B ژنوم انگل‌های لیشمانیا برای تعیین آلودگی و هویت گونه‌های انگل در پشه خاکی‌های منطقه گرمی استان اردبیل که مهم‌ترین کانون بومی بیماری لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در کشور است، استفاده شده است.

نتایج: نتایج مطالعه نشان داد که ژنوم کینتوپلاست DNA، بخش‌های غیرقابل ترجمه ژن‌های ریبوزوم و سیستمین پروتئاز B به‌ترتیب برای تعیین لپتوموناد یا بررسی‌های اولیه، شناسایی کمپلکس دونوانی و تعیین هویت اعضای کمپلکس دونوانی مناسب هستند. این مطالعه برای اولین بار ثابت نمود که در منطقه مورد مطالعه هر دو عضو کمپلکس دونوانی یعنی لیشمانیا دونوانی و لیشمانیا اینفانتوم وجود دارند و هر دو انگل توسط پشه خاکی‌های فلپوتوموس پرفیلیوی ترانس کوکازیکوس انتقال پیدا می‌کنند.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از آلودگی طبیعی پشه خاکی‌ها به لیشمانیا دونوانی در ایران است. با توجه به این‌که لیشمانیا دونوانی دارای اکولوژی و زیست‌شناسی کاملاً متفاوت از لیشمانیا اینفانتوم است، ضروری است که مطالعات بیشتری درباره نقش این گونه از کمپلکس در اپیدمیولوژی بیماری در منطقه و کشور انجام شود.

کلیدواژگان: کالاآزار، پشه خاکی، DNA کینتوپلاست، DNA ریبوزومال، سیستمین پروتئاز B.

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

۱- مقدمه

لیشمانیوزها (Leishmaniose) مجموعه‌ای از بیماری‌ها هستند که توسط انگل‌های داخل سلولی اجباری تاژکدار متعلق به جنس لیشمانیا (*Leishmania*) ایجاد می‌شوند. از ۳۰ گونه انگل لیشمانیای نام‌گذاری شده، حدود ۱۰ گونه آن از لحاظ پزشکی و دامپزشکی حائز اهمیت هستند [۱]. این بیماری‌ها به‌صورت بومی در تمام نقاط جهان حضور داشته و بار تحمیلی (Disability-adjusted life years: DALYs) آن‌ها ۲۳۵۷۰۰۰ مورد ناتوانی و ۵۹۰۰۰ مورد مرگ و میر در سال گزارش شده است [۲، ۳]. این بیماری‌ها به‌صورت نشانگان‌هایی، از زخم‌های جلدی خود به خود بهبودشونده تا علائم احشایی کشنده ظاهر می‌شوند. اشکال احشایی بیماری توسط انگل‌های متعلق به کمپلکس لیشمانیا دنووانی (*Leishmania donovani complex*) ایجاد می‌شوند. با توجه به اپیدمیولوژی و اکولوژی بیماری از جمله عامل، ناقل، مخزن بیماری و نیز گروه‌های سنی درگیر، بیماری به چهار تیپ هندی، مدیترانه‌ای، آفریقایی و آمریکایی تقسیم می‌شود [۴]. لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع Zoonotic Visceral Leishmaniasis (ZVL) و تیپ مدیترانه‌ای است که در تمام کشور به جز سیستان و بلوچستان به‌صورت اسپورادیک (Sporadic) وجود دارد [۵]. چهار کانون عمده بیماری استان‌های اردبیل (مشکین‌شهر، گرمی و اردبیل)، فارس (قیر، کارزین، جهرم، فیروزآباد و مرودشت)، آذربایجان شرقی (اهر، کلیبر و آذرشهر) و بوشهر (برازجان و خورموج) هستند.

ناقلین بیماری در کانون شمال غرب کشور پشه خاکی‌های فلبوتوموس پرفیلیوی (*Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus*) و فلبوتوموس کاندلاکی (*P. kandelakii*) و در کانون جنوب کشور فلبوتوموس الکساندری (*P. alexandri*)، فلبوتوموس ماژور (*P. major*) و فلبوتوموس کشیشیانی (*P. keshishiani*) هستند [۶، ۷]. سگ‌ها مخزن اهلی بیماری و سگ‌سانان دیگر مانند گرگ، روباه و شغال مخازن وحشی بیماری محسوب می‌شوند. جوندگان نیز در سال‌های اخیر به‌عنوان مخزن بیماری

مورد توجه بوده‌اند [۵، ۸]. براساس آمار مرکز مدیریت مبارزه با بیماری‌های وزارت بهداشت طی سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۷۷ تعداد ۲۰۵۶ مورد بیماری در ایران گزارش شده که ۶۲۴ مورد آن (۳۰ درصد) مربوط به استان اردبیل است.

دو روش مرسوم میکروسکوپی و تزییق به حیوانات حساس آزمایشگاهی و جداسازی انگل از طریق محیط کشت برای تعیین و تخمین میزان آلودگی حشرات ناقل و مخازن بیماری به‌کار می‌روند. هر دو روش فوق سخت، طولانی مدت، کاربر و غیردقیق هستند و از طرف دیگر به لحاظ شباهت ریخت‌شناختی گونه‌ها و زیرگونه‌ها، ارزش تشخیصی این دو روش پایین بوده و بایستی از مطالعات تکمیلی مانند آنالیز ایزوآنزیم‌ها یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای تعیین گونه و زیرگونه‌های انگل جداسازی شده استفاده شود [۹]. در این میان مشکلات مربوط به آلودگی‌های محیط کشت و از بین رفتن انگل‌های جداسازی شده و نیز گرانی و زمان‌بر بودن روش آنالیز ایزوآنزیم‌ها از عمده‌ترین مشکلاتی هستند که مطالعات آزمایشگاهی کلاسیک با آن مواجه هستند. روش‌های نوین مولکولی مبتنی بر PCR هیچ‌کدام از این مشکلات را نداشته و مستقیماً با استفاده از مقدار کمی DNA بافت آلوده، قادر به ردیابی و شناسایی انگل‌های لیشمانیا هستند [۱۰، ۱۱]. بسته به اهداف مطالعه بخش‌های متغیر یا حفاظت‌شده ژنوم انگل تکثیر می‌شود. عموماً به‌منظور تشخیص آلودگی لپتومونادی از توالی‌های تکراری (Tandem Repeat) مانند حلقه‌های کوچک (minicircle) DNA کیتوپلاست (Kinetoplast DNA: kDNA) استفاده می‌شود. انتخاب این توالی‌ها در سطح جنس یا گونه موجب افزایش حساسیت روش می‌شود. این حلقه‌ها به تعداد حدود ۱۰۰۰۰ در هر سلول لیشمانیا برای تشخیص اولیه آلودگی لپتومونادی در پشه خاکی‌ها بسیار مفید است. برای تفکیک نمونه‌ها در سطح گونه و پایین‌تر از آن، از بخش‌هایی مانند DNA ریبوزوم و سیستمین پروتاز (Cysteine protease) استفاده می‌شود [۱۲].

به‌علت یکسان بودن طول محصول PCR قطعات ITS (Internal Transcribed Spacer) ژن ریبوزوم (rDNA) [۵] و کیتوپلاست DNA [۹] برای سه نوع انگل لیشمانیا دنووانی،

متغیر (روستاهای حسی‌کندی، سروآغاجی و قاسم‌کندی) انجام شد. براساس مطالعات قبلی، پیک فعالیت پشه خاکی‌ها و آلودگی آن‌ها به انگل در اواسط تابستان است. صید پشه خاکی‌ها با استفاده از تله چسبان در اماکن داخلی (انسانی و حیوانی) و اماکن خارجی (مصنوعی و طبیعی) انجام شد. بعد از شستشوی نمونه‌ها، قسمت میانی بدن به منظور استخراج DNA جدا و سر و انتهای بدن نیز برای شناسایی گونه پشه خاکی با استفاده از محلول پوری (Pori) مونته شد.

۲-۲- استخراج DNA پشه خاکی‌ها و واکنش‌های PCR

بدن پشه خاکی در داخل لوله‌های استریل به کمک میله‌های شیشه‌ای کاملاً خرد شده و به دنبال آن استخراج DNA به روش تعدیل یافته آرانسای (Aransay) و همکاران انجام شد [۹]. در این روش علیرغم فرایند طولانی و شستشوی متوالی DNA کاملاً خالص و با کیفیت عالی حاصل می‌شود که با توجه به حجم کوچک بدن پشه خاکی بسیار سودمند است. همچنین DNA سویه استاندارد لیثمانیا (دونووانی) اینفانتوم (AY896776) MHOM/FR/87/LEM1098 (*L.d.infantum*) و سویه استاندارد لیثمانیا (دونووانی) (AY896785) MHOM/ET/00/HUSSEN (*L.d.donovani*) از طرف دکتر هاید استاد دانشگاه مونته‌پولیر (Montpellier University) فرانسه برای نویسندگان مقاله ارسال شد. از DNA پشه خاکی‌های نر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نشانگر (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت Fermentas آلمان به عنوان معیار اندازه‌گیری طول محصولات PCR استفاده شد.

۲-۳- تعیین آلودگی لپتومونادی با Semi-nested PCR

برای تعیین آلودگی لپتومونادی از واکنش‌های Semi-nested PCR و تکثیر جایگاه kDNA استفاده شد. این یک واکنش دو مرحله‌ای است که در مرحله اول، قطعه‌ای بزرگ از ژنوم هدف تکثیر شده و در مرحله دوم با کمک

لیثمانیا اینفانتوم (*L. infantum*) و لیثمانیا تروپیکا (*L. tropica*) (عوامل ایجادکننده لیثمانیوز احشایی) لازم است با تعیین توالی یا آغازگرهای (Primers) اختصاصی دیگر هویت انگل مشخص شود. هاید (Hide) و همکاران با استفاده از آغازگرهای بخشی از ژن سیستین پروتاز نوع B (Cysteine protease B: CPB) که دارای کپی E اختصاصی لیثمانیا اینفانتوم و کپی F اختصاصی لیثمانیا دنووانی است. انگل‌های لیثمانیا دنووانی و لیثمانیا اینفانتوم را با اختلاف ۳۹ جفت‌باز از هم‌دیگر و از سایر انگل‌های لیثمانیا تروپیکا، لیثمانیا ماژور (*L. major*)، لیثمانیا مکسیکانا (*L. mexicana*)، لیثمانیا برازیلینسیس (*L. braziliensis*)، لیثمانیا گایانسیس (*L. guyanensis*)، لیثمانیا تارنتولا (*L. tarentolae*) و لیثمانیا لینسونی (*L. lainsoni*) و تریپانوزوما بروسه‌ای (*Trypanosoma brucei*) و تریپانوزوما کروزه‌ای (*T. cruzi*) به راحتی تفکیک نمودند [۱۳].

در این مطالعه با استفاده از PCR جایگاه‌های (Loci) حلقه‌های کوچک ژنوم سیتوپلاسمیک کیتوپلاست و دو جایگاه هسته‌ای شامل بخش‌های غیرقابل ترجمه ژن‌های ریپوزوم (ITS-rDNA) و ژن CPB ژنوم لیثمانیا آلودگی لپتومونادی، آلودگی به کمپلکس دنووانی و در نهایت تعیین هویت قطعی انگل‌های لیثمانیا دنووانی و لیثمانیا اینفانتوم پشه خاکی‌های منطقه گرمی استان اردبیل بررسی شد. محصولات PCR جایگاه‌های ITS-rDNA و CPBs تعیین توالی شده و با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی (Genbank) مقایسه و روابط فیلوژنی آن‌ها مشخص شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- منطقه مورد مطالعه و جمع‌آوری نمونه

شهرستان گرمی یکی از ۱۰ شهرستان استان اردبیل است که در حدود شمال شرقی استان واقع شده است. براساس مطالعات سرواپیدمیولوژی انجام شده در منطقه [۵] و نیز آمارهای منتشره توسط مرکز بهداشت گرمی مناطق با آلودگی بالا شناسایی شده و جمع‌آوری پشه خاکی‌های مشکوک به آلودگی از سه ایستگاه ثابت (روستاهای کلانسرا، حمزه‌خانلو و شاه‌تپه‌سی) و سه ایستگاه

۲-۴- واکنش‌های PCR جایگاه ITS-rDNA

برای تعیین هویت انگل‌های لیثمانیا در مورد نمونه‌هایی که در واکنش‌های Semi-nested PCR، جایگاه kDNA تکثیر و مثبت شده بودند از واکنش‌های PCR جایگاه ITS-rDNA استفاده شد. ژن rDNA بخشی از ژنوم هسته است که در سطح گونه یکنواختی نشان می‌دهد اما طول و توالی آن در گونه‌های مختلف متغیر است. کاپولیلو (Cupolillo) و همکاران (۱۹۹۵) آغازگرهایی معرفی نموده‌اند که قطعه ITS را در تمامی گونه‌های لیثمانیا تکثیر

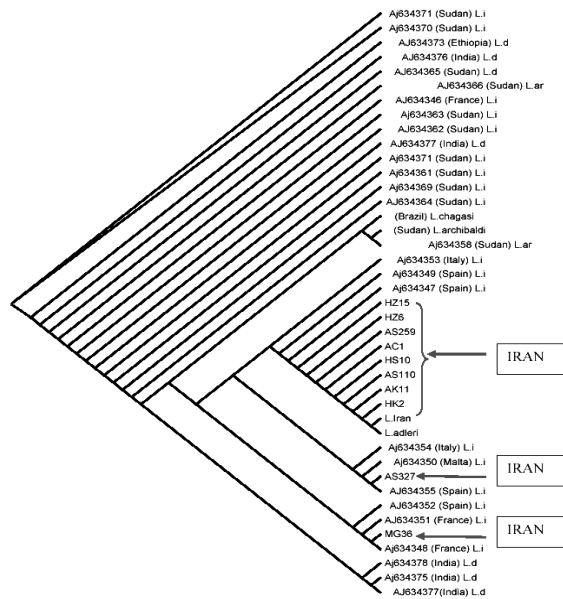
محصول اولیه قطعه‌ای کوچک‌تر از روی قطعه بزرگ‌تر ساخته می‌شود. به این منظور از آغازگرهای طراحی شده توسط آرانسای و همکاران که برای انگل‌های لیثمانیا دونووانی، لیثمانیا اینفانتوم، لیثمانیا تروپیکا، لیثمانیا آمازوننسیس (*L. amazonensis*)، لیثمانیا برازیلینسیس، لیثمانیا مکسیکانا محصولی به طول ۷۲۰ جفت‌باز و برای انگل‌های لیثمانیا ماژور و لیثمانیا اتیوپیکا (*L. aethiopica*) محصولی به طول ۶۵۰ جفت‌باز ایجاد می‌نماید، استفاده شد [۹].

جدول ۱ مشخصات آغازگرها، مواد مورد نیاز و برنامه حرارتی مورد استفاده در تکثیر بخش‌های مختلف ژنوم انگل لیثمانیا.

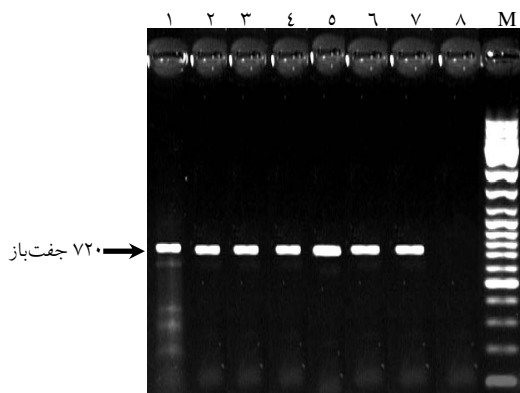
نام آغازگر	جایگاه هدف	توالی 5'-3'	آغازگر (میکرومول)	dNTPs (میکرومول)	DNA (میکرومول)	اتصال آغازگر (زمان و درجه سانتی‌گراد)	حجم (میکرومول)	چرخه‌ها
LINR4 LIN17 LIN19	kDNA	GGGGTTGGTGTAAAATAGGG	۱	۲۰۰	۱	۳۰/۵۲ ثانیه	۱۰	۱۷
		TTTGAACGGGATTCTG	۰/۲					
		CAGAACGCCCTACCCG	۱	۲۰۰	-	۳۰/۵۸ ثانیه	۹۰	۳۳
IR1 IR2	rDNA-ITS	GCTGTAGGTGAACCTGCAGC-AGCTGGATCATT	۱	۲۵۰	۱	۳۰/۵۸ ثانیه	۲۰	۳۷
		GCGGGTAGTCCTGCCAAACA-CTCAGGTCTG	۱					
LinfRR LinFF	CPB	CGTGCACCTCGGCCGTCTT	۱/۳	۱۶۰	۲	۱/۶۱ دقیقه	۳۰	۳۰
		CGTGACCCGGTGAAGAAT	۱/۳					

جدول ۲ مشخصات ۱۵۶۹ نمونه پشه خاکی ماده و ۱۸۷۸ نمونه پشه خاکی نر متعلق به ۱۳ گونه مختلف صید شده از اماکن مختلف انسانی، حیوانی و طبیعی منطقه گرمی استان اردبیل به تفکیک نر و ماده و آلودگی لیثمانیایی. ماده‌های گونه چایننسیس گروپ (*Chinensis group*) از هم قابل تفکیک نیستند در حالی که نرهای آن‌ها قابل تفکیک بوده و سه گونه از آن‌ها شامل فلبوتوموس برویس (*Phlebotomus brevis*)، فلبوتوموس هالپنسیس (*P. halepensis*) و فلبوتوموس لانگی‌داکتوس (*P. longiductus*) در منطقه شناسایی شد.

نرها			ماده‌ها			
درصد	تعداد	گونه	نمونه مثبت	درصد	تعداد	گونه
۶۰/۹۷	۱۱۴۵	فلبوتوموس پرفیلیوی	۹	۶۰/۸۰	۹۵۴	فلبوتوموس پرفیلیوی
۲/۷۷	۵۲	فلبوتوموس توبی (<i>P. tobbi</i>)	---	---	---	-----
۳/۵۱	۶۶	فلبوتوموس برویس	۱	۸/۳۵	۱۳۱	چایننسیس گروپ
۰/۲۷	۵	فلبوتوموس هالپنسیس				
۰/۰۵	۱	فلبوتوموس لانگی‌داکتوس				
۸/۷۳	۱۶۳	فلبوتوموس پاپاتاسی	۱	۳	۴۷	فلبوتوموس پاپاتاسی (<i>P. papatasi</i>)
۳/۳۵	۶۳	فلبوتوموس کاندلاکی	۱	۲/۸۷	۴۵	فلبوتوموس کاندلاکی
۸/۰۴	۱۵۱	فلبوتوموس سرژنتی	۰	۲/۰۵	۳۲	فلبوتوموس سرژنتی (<i>P. sergenti</i>)
۲/۷۷	۵۲	فلبوتوموس الکساندری	۰	۰/۰۶	۱	فلبوتوموس الکساندری
۰/۲۷	۵	فلبوتوموس مونگولنسیس	۰	۰/۰۶	۱	فلبوتوموس مونگولنسیس (<i>P. mongolensis</i>)
۱/۴۳	۲۷	سرژنتومیا دنتاتا	۲	۱۹/۹۵	۳۱۳	سرژنتومیا دنتاتا (<i>S. dentata</i>)
۷/۵۶	۱۴۲	سرژنتومیا سینتونی	۰	۲/۸	۴۴	سرژنتومیا سینتونی (<i>S. sintoni</i>)
۰	۰	سرژنتومیا پالووسکی	۰	۰/۰۶	۱	سرژنتومیا پالووسکی (<i>S. pawlowsky</i>)
۱۰۰	۱۸۷۸	جمع	۱۴	۱۰۰	۱۵۶۹	جمع



نمودار ۱ درخت فیلوژنی (کلادوگرام) حاصل از مقایسه ۵۳۴ جفت‌باز توالی‌های ITS2 نمونه‌های *Leishmania infantum* دنووانی کمپلکس منطقه گرمی اردبیل در ایران و سایر نمونه‌های موجود در بانک جهانی ژن‌ها. شماره‌های دسترسی نمونه در بانک ژنی و کشور مبدأ نشان داده شده است. L.d معرف لیشمانا دنووانی و L.i معرف لیشمانا اینفانتوم است.



شکل ۱ محصول PCR بخش حلقه‌های کوچک kDNA لپتومونادها داخل معده پشه خاکی‌های منطقه گرمی اردبیل. ستون‌های ۱-۵: نمونه‌های پشه خاکی‌های آلوده؛ ستون ۶: سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) (دونووانی) MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785): ستون ۷: سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) اینفانتوم (AY896776) (MHOM/FR/87/LEM1098): ستون ۸: کنترل منفی (پشه خاکی نر) و M: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی Fermentas

از بین ۱۴۰۰ پشه خاکی ماده بررسی شده توسط روش Semi-nested PCR از طریق جایگاه کیتوپلاست، ۱۴ نمونه مثبت و آلوده به لپتوموناد مشاهده شد که محصول واکنش در حدود

می‌نماید. این آغازگرها اختصاصی جنس لیشمانیا بوده و قطعه‌ای به طول تقریبی ۱ کیلو جفت‌باز ایجاد می‌نمایند [۱۴].

۲-۵- واکنش‌های PCR جایگاه CPB

در این مطالعه برای شناسایی مستقیم انگل لیشمانیا اینفانتوم از آغازگرهای هاید و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. این آغازگرها اختصاصی اعضای کمپلکس دنووانی بوده و قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۰۲ جفت‌باز برای لیشمانیا اینفانتوم (کپی E ژن) و ۷۴۱ جفت‌باز برای لیشمانیا دنووانی (کپی F ژن) ایجاد می‌نمایند [۱۳].

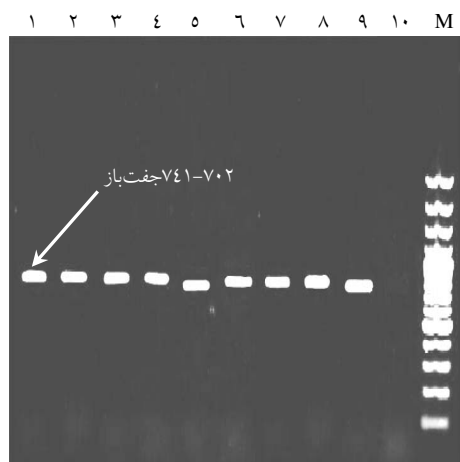
مشخصات آغازگرهای مورد استفاده، اجزاء و مقادیر مورد نیاز واکنش‌ها و برنامه حرارتی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

۲-۶- تعیین توالی و آنالیز توالی‌ها

محصول PCR بخش‌هایی از جایگاه‌های ITS و CPBs برای تعیین توالی به شرکت SeqLab آلمان ارسال شد. برای اطمینان از صحت توالی نمونه‌ها و میزان مشابهت آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژنی، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Blast (www.ncbi.nih.gov/blast) بررسی شدند. به منظور بررسی روابط فیلوژنیک نمونه‌ها از الگوریتم Maximum Parsimony موجود در نرم‌افزار Phylip تعبیه شده در برنامه ClustalW استفاده شد و درخت‌های فیلوژنی (کلادوگرام) و Cladogram و فیلوگرام (Phylogram) به کمک نرم‌افزار Tree view ترسیم شدند.

۳- نتایج

نتایج مطالعات حشره‌شناسی نشان داد که در منطقه گرمی در زمان مطالعه، ۱۳ گونه مختلف (۳ گونه از سرژاتومیایا (*Sergentomyia*) و ۱۰ گونه از فلبتوموس (ها) پشه خاکی وجود دارد (جدول ۲). به نظر می‌رسد که فلبتوموس پرفیلیوسی ترانس‌کوکازیکوس (*P. perfiliewi transcaucasicus*) با وفور تقریبی ۶۱ درصد و میزان آلودگی ۰/۹۴ درصد، ناقل اصلی کالازار (Kala-azar) در منطقه گرمی استان اردبیل باشد.



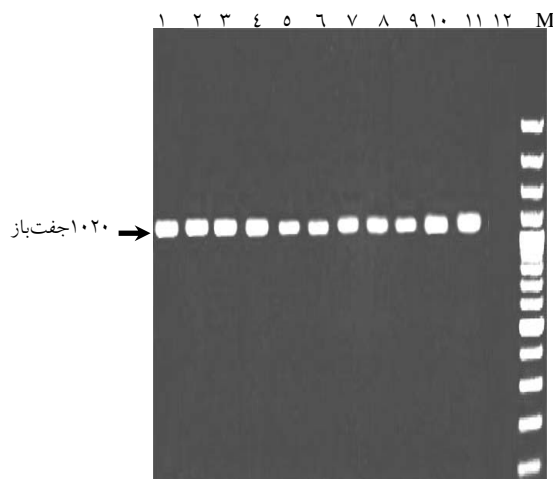
شکل ۳ محصول PCR بخشی از ژن CPB کمپلکس لیشمانیا دنووانی داخل معده پشه خاکی‌های منطقه گرمی اردبیل. ستون ۱: سویه استاندارد لیشمانیا (دنووانی) دنووانی MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785); ستون‌های ۲-۴ و ۶-۸ لیشمانیا دنووانی به طول ۷۴۱ جفت‌بازی یافت شده در بدن پشه‌خاکی‌ها؛ ستون‌های ۵ و ۹: به ترتیب مربوط به لیشمانیا اینفانتوم یافت شده در این مطالعه (ایران) و اینفانتوم استاندارد لیشمانیا (دنووانی) اینفانتوم MHOM/FR/87/LEM1098 (AY896776) به طول ۷۰۲ جفت‌باز؛ ستون ۱۰: کنترل منفی (پشه‌خاکی نر) و M: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت Fermentas.

این ژن دارای دو کپی E (لیشمانیا دنووانی) اینفانتوم و F (لیشمانیا دنووانی) دنووانی بوده و این دو گونه بر مبنای ۳۹ جفت‌باز اختلاف در طول ژن از همدیگر و از سایر انگل‌های لیشمانیا قابل تفکیک هستند. نتایج PCR این ژن نشان داد که یک مورد از ۷ مورد مثبت، گونه لیشمانیا دنووانی اینفانتوم (کپی E) عامل بیماری کالآزار تیپ مدیترانه‌ای و ۶ مورد بقیه گونه لیشمانیا دنووانی دنووانی (کپی F) عامل بیماری کالآزار تیپ سودانی است. بدین ترتیب در منطقه گرمی استان اردبیل یا کانون لیشمانیوز احشایی شمال غرب کشور به صورت همزمان هر دو عضو کمپلکس دنووانی وجود دارند. برای تأیید نتایج فوق محصولات PCR ژن CPB تعیین توالی و با شماره‌های دسترسی EU637908 الی EU637913 در بانک جهانی ژن ثبت شدند.

بررسی توالی‌های ژن CPB و مقایسه آن‌ها با توالی‌های بانک ژنی درستی نتایج PCR را تأیید نمود و دقیقاً مانند سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن، اختلاف ۳۹ جفت‌باز بین ۱ نمونه کپی E و سایر ۶ نمونه کپی‌های F مشاهده شد. بررسی

۷۲۰ جفت‌باز ایجاد شد (شکل ۱). این آلودگی لپتومونادی می‌تواند مخلوطی از انگل‌های لیشمانیا دنووانی، لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا تروپیکا و سارولیشمانیا (*Sauroleishmania*) (لیشمانیا خزندگان) باشد. از مجموع ۱۴ نمونه پشه خاکی با آلودگی لپتومونادی براساس kDNA، تعداد ۱۱ مورد با PCR بخش ITS با طول حدود ۱۰۲۰ جفت‌باز مشاهده شد (شکل ۲). این ۱۱ مورد بیان‌کننده آلودگی پشه خاکی‌ها به انگل‌های کمپلکس لیشمانیا دنووانی است. توالی‌های قسمت ITS2 از بخش ITS تعیین توالی و در بانک جهانی ژن با شماره‌های دسترسی EU637914 الی EU637924 به ثبت رسیدند. بررسی توالی‌های بخش ITS2 و مقایسه آن‌ها با توالی‌های بانک ژنی و نیز ترسیم درخت فیلوژنی، نشان داد که نمونه‌های ایران متعلق به کمپلکس لیشمانیا دنووانی بوده و ۹۹-۱۰۰ درصد مشابه با نمونه‌های جنوب اروپا (اسپانیا، ایتالیا و فرانسه) هستند (نمودار ۱). به هر حال به علت مشابهت بسیار بالای اعضای کمپلکس براساس این ژن نمی‌توان مشخص نمود که نمونه‌های ایران متعلق به کدام عضو کمپلکس دنووانی هستند.

برای تعیین هویت ۱۱ نمونه فوق، واکنش PCR برای ژن CPB انجام و تنها ۷ عدد از نمونه‌ها به طور موفقیت‌آمیز در این واکنش مثبت شدند (شکل ۳).



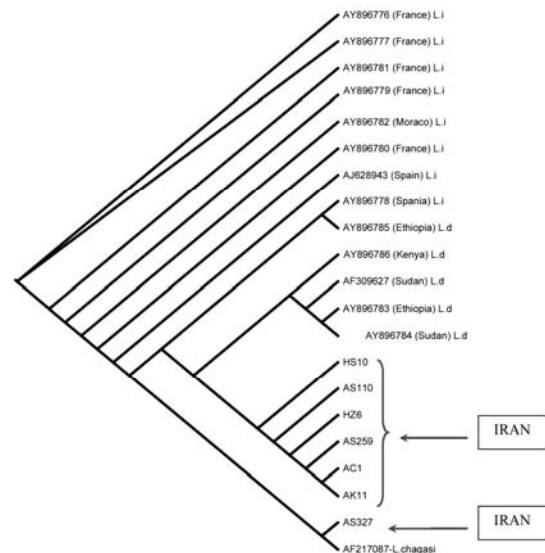
شکل ۲ محصول PCR بخش ITS لپتومونادهای داخل معده پشه خاکی‌های منطقه گرمی اردبیل. ستون‌های ۱-۹: نمونه‌های پشه خاکی‌های آلوده؛ ستون ۱۰: سویه استاندارد لیشمانیا دنووانی اینفانتوم (AY896776) MHOM/FR/87/LEM1098؛ ستون ۱۱: سویه استاندارد لیشمانیا دنووانی (دنووانی) دنووانی MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785)؛ ستون ۱۲: کنترل منفی (پشه خاکی نر) و M: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت Fermentas.

نماید [۹]. در این مطالعه پشه خاکی های فلبوتوموس پرفیلیوی ترانس کوکازیکوس با وفور تقریبی ۶۱ درصد و میزان آلودگی حدود ۱ درصد نقش اصلی انتقال کالاآزار را در منطقه گرمی به عهده دارند و مبارزه هدفمند با این گونه می تواند منجر به کنترل بهتر و مؤثر بیماری شود.

در مطالعات مختلف بسته به هدف مطالعه از بخش های مختلف ژنوم انگل استفاده می شود. در این مطالعه برای بررسی اولیه و تعیین آلودگی لپتومونادی از بخش حلقه های کوچک کیتوپلاست که تعداد آن ۱۰۰۰۰ مولکول در هر سلول بوده و به صورت شبکه ای به هم تابیده دیده می شود استفاده شد. به لحاظ فراوانی این بخش از ژنوم، جستجوی اولیه لیشمانیاها بسیار آسان و مناسب است. اگرچه این بخش بسیار متغیر بوده و طول آن در گونه های مختلف لیشمانیا در حدود ۶۰۰-۸۰۰ جفت باز است و از آن در تفکیک گونه های مختلف انگل لیشمانیا استفاده می شود [۱۲]، ولی این تغییرات در بین افراد گونه هم گزارش شده است بنابراین تعیین توالی این بخش مشکل بوده و برای تعیین هویت گونه ها سودمند نخواهد بود.

در این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل ها (نمونه های مثبت شده از طریق حلقه های کوچک کیتوپلاست)، از توالی بخشی از ITS ژن rDNA که در گونه های مختلف متغیر است استفاده شد [۱۵]. این ژن در تعیین هویت گونه ها کاملاً مناسب است ولی در سطح کمپلکس دونووانی کارایی چندانی ندارد. شونیان (Schonian) و همکاران نشان دادند که بخش ITS انگل های متعلق به کمپلکس دونووانی در مقایسه با سایر لیشمانیاها چندشکلی (Polymorphism) کمتری دارند [۱۶]. نتایج حاصل از مقایسه توالی های بخش ITS ژن rDNA موجود در بانک ژنی نشان می دهد که این بخش از ژنوم در تفکیک اعضای کمپلکس دونووانی حساسیت لازم را ندارد. با وجود تفاوت در میکروساتلایت های (Microsatellites) این ژن در اعضای کمپلکس دونووانی که در بخش ITS1 حدود ۲/۹ درصد و در ITS2 حدود ۲/۳ درصد است، این تفاوت ها قابل اعتماد نبوده و حتی در یک گونه مشخص نیز پراکندگی ثابتی ندارند. براساس مطالعات فیلوژنی کالس (Kuhls) و

درخت فیلوژنی حاصل از توالی های این ژن نشان داد که نمونه های کپی های F ایران مشابهت و قرابت بسیار نزدیکی با نمونه های آفریقایی کنیا، سودان و اتیوپی دارد در حالی که کپی E ایران با لیشمانیا شاگازی (*L.d.chagasi*) (گونه مترادف لیشمانیا ایفانتوم) آمریکای جنوبی شباهت دارد (نمودار ۲).



نمودار ۲ درخت فیلوژنی (کلادوگرام) حاصل از مقایسه ۶۷۰ جفت باز از توالی های ژن CPBs نمونه های لیشمانیا دونووانی کمپلکس منطقه گرمی اردبیل در ایران و سایر نمونه های موجود در بانک جهانی ژن ها. شماره های دسترسی نمونه در بانک ژنی و کشور مبدأ نشان داده شده است. L.d معرف لیشمانیا دونووانی و L.i معرف لیشمانیا ایفانتوم است.

۴- بحث

کنترل بیماری لیشمانیوز در مناطق بومی، نیازمند آگاهی از اکولوژی و اپیدمیولوژی انگل، میزان مخزن و نیز ناقل بیماری دارد. در این راستا شناسایی مخازن و جستجوی ناقلان آلوده یکی از مشکلات اساسی مسئولین کنترل بیماری محسوب می شود. یافتن پشه خاکی های آلوده به انگل، گامی اساسی در شناسایی گونه های ناقل و نیز پتانسیل انتقال بیماری در مناطق بومی است. به لحاظ پایین بودن آلودگی انگلی در اغلب کانون های لیشمانیوز احشایی یافتن لپتوموناد در بدن پشه خاکی هایی که تمایل زیاد به خونخواری از انسان (آنتروپوفیل: Anthropophilic sandflies) دارند کافی است که آن را به عنوان ناقل احتمالی بیماری معرفی

واقعی‌تر و صحیح‌تری را ارائه می‌نمایند. در این مطالعه برای اولین بار علاوه بر انگل لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا دونووانی نیز در پشه خاکی‌های ایران گزارش می‌شود. بدین ترتیب دو گونه لیشمانیا (دونووانی) اینفانتوم و لیشمانیا (دونووانی) دونووانی به صورت توأم در منطقه گرمی استان اردبیل توسط پشه خاکی‌ها بین مخزن و انسان منتقل می‌شوند. آلودگی توأم دو گونه انگل عامل کالاآزار در کشورهای مجاور مانند عربستان و ترکیه و نیز در چین قبلاً گزارش شده است [۱۷] به نظر می‌رسد با توجه به تغییرات اکولوژیکی، جابه‌جایی جمعیت‌های انسانی و پدیده گرم شدن هوا، بیماری کالاآزار در جهان در حال گسترش است و در آینده ممکن است کانون‌های نوپدید بیشتری از بیماری در ایران و سایر نقاط جهان ظاهر شوند.

۵- تشکر و قدردانی

نتایج مطالعه انجام شده حاصل طرح تحقیقاتی شماره TDR6/36، T5/72/6، SGS06/77 است که با پشتیبانی مالی سازمان بهداشت جهانی (WHO) و دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

همکاران با استفاده از بخش ITS نشان داده شد که سویه دونووانی چین قرابت خیلی زیادی با دونووانی‌های سودان و اتیوپی دارد ولی از طرف دیگر سویه‌های لیشمانیا اینفانتوم سودان در مجاورت نمونه‌های هندوستان قرار می‌گیرند [۱۷]. این محققین نتیجه‌گیری کردند که بخش‌های اشاره شده ژن rDNA تنها از لحاظ بررسی‌های جمعیتی مناسب هستند. تفاوت‌های مشاهده شده در دو درخت شجره‌شناسی حاصل از توالی‌های ITS2 و CPB این مطالعه نیز جایگاه‌های متفاوتی برای نمونه‌های ایران نشان می‌دهند. براساس بخش ITS2 نمونه‌های ایران مشابه لیشمانیا دونووانی جنوب اروپا و براساس بخش CPB مشابه نمونه‌های لیشمانیا دونووانی آفریقا هستند. علت این امر آن است که اولاً براساس بخش ITS دو گونه لیشمانیا دونووانی و لیشمانیا اینفانتوم به راحتی قابل تفکیک نیستند و ثانیاً چون این بخش از ژنوم نقشی در خصوصیات بیماری‌زایی و آنتی‌ژنیک انگل ندارد، تفاوت قابل توجهی بین اعضای این گونه کمپلکس ایجاد نشده است. از طرف دیگر به نظر می‌رسد ژن CPB به واسطه اهمیت بسیار زیاد در بیماری‌زایی و خصوصیات آنتی‌ژنیک متفاوتی [۱۸] که در گونه‌های مختلف ایجاد می‌نماید درخت‌های فیلوژنی

۶- منابع

- [1] Bates PA. Transmission of *Leishmania metacyclic promastigotes* by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37(10): 1097-106.
- [2] WHO, TDR Strategic Direction for Research: *Leishmaniasis*, 2002, Available at: www.who.int/tdr.
- [3] http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html.
- [4] WHO Tech Rep Ser. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Techn 1990. Ser. 793: 1-158.
- [5] Mohebalı M, Hajjarañ H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhounđı B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol* 2005; 129(3-4): 243-51.
- [6] Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi Ershadi MR, Mohebalı M. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100(1): 63-8.
- [7] Rassi Y, Javadian E, Nadim A, Zahraii A, Vatañdoost H, Motazedian H, Azizi K, Mohebalı M. *Phlebotomus (Larrossius) kandelakii*: the principle and proven vector of visceral leishmaniasis in Northwest of Iran. *Pakistan J*

- Biol Sci 2005; 8(12): 1802-6.
- [8] Mohebalı M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjara n H, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2004; 10(4-5): 591-9.
- [9] Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 1933-8.
- [10] Hatam GR, Ardehali S, Motazedian MH, Sadjadi M, Fakorziba MR. The methods of isolation and characterization of Leishmania parasites. Publication of Medical Science University of Shiraz, Shiraz, 2005, p: 175.
- [11] Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123: 311-30.
- [12] Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Adv Parasitol 2007; 64: 1-109.
- [13] Hide M, Banuls AL. Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. Acta Trop 2006; 100(3): 241-5.
- [14] Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 1995; 73(1-2): 145-55.
- [15] Kokozidou M. Evaluation of PCR methods for detection, species identification and determination of genetic variation in *L. infantum*. Presented for the Ph.D. Giessen (Germany), Justus-Liebig-University Giessen, 2003.
- [16] Schönian G, El Fari M, Lewin S, Schweynoch C, Presber W. Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. Med Microbiol Immunol 2001; 190(1-2): 61-3.
- [17] Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the Leishmania donovani complex. Microbes Infect 2005; 7(11-12): 1224-34.
- [18] Hide M, Bucheton B, Kamhawi S, Bras-Gonçalves R, Sundar S, Lemesre JL, Banuls AL. Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. 87-133. Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies, Ed.: M Tibayrenc, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 2007; P: 747.

