مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۸۱-۸۹
بهار و تابستان ۱۳۸۷

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

ناصح ملکی‌راواسان[۱]، محمدعلی عشاقی[۲*]، عزت‌الدین جوادیان[۳]، یاور راثی[۴]، مهدی محبعلی[۵]، جاوید صدرایی[۶]، ذبیح‌ا.. 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 ومبارزه 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 ومبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۷

چکیده

هدف: امروزه از اپیدمیولوژی مولکولی در تحقیقات مختلف اپیدمیولوژیکی بیماری لشمانیوز 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 سیستئین پروتئاز B ژنوم انگل‌های لیشمانیا برای تعیین آلودگی و هویت گونه‌های انگل در پشه خاکی‌های منطقه گرمی استان اردبیل که مهم‌ترین کانون بومی بیماری لشمانیوز احشایی (کالاآزار) در کشور است، استفاده شده است.

نتایج: نتایج مطالعه نشان داد که ژنوم کینتوپلاست DNA، بخش‌های غیرقابل ترجمه ژن‌های ریبوزوم و سیستئین 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 فلبوتوموس 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، سیستئین پروتئاز B.

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، صندوق پستی: ٦٤٤٦-١٤١٥٥.
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 [٤]. لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع ZVL (Zoonotic Visceral Leishmaniasis) 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 [٦، 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 ۲۰۵٦ مورد بیماری در ایران گزارش شده که ٦۲٤ مورد آن (۳۰ درصد) مربوط به استان اردبیل است.

دو روش مرسوم میکروسکوپی و تزریق 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 جداشده 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 DNA (minicircle) کینتوپلاست (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 سیستئین پروتئاز (Cysteine protease) استفاده می‌شود [۱۲].

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

لیشمانیا اینفانتوم *(L. infantum)* و لیشمانیا تروپیکا *(L. tropica)* (عوامل ایجادکننده لیشمانیوز 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 سیستئین پروتئاز نوع B (Cysteine protease B: CPB) که دارای کپی E اختصاصی لیشمانیا اینفانتوم و کپی F اختصاصی لیشمانیا دنووانی است. انگل‌های لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا اینفانتوم را با اختلاف ۳۹ جفت‌باز از هم‌دیگر و از سایر انگل‌های لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور *(L. major)*، لیشمانیا مکسیکانا *(L. mexicana)*، لیشمانیا برازیلینسیس *(L. braziliensis)*، لیشمانیا گایاننسیس *(L. guyanensis)*، لیشمانیا تارنتولا *(L. tarentolae)* و لیشمانیا لینسونی *(L. lainsoni)* و تریپانوزوما بروسه‌ای *(Trypanosoma brucei)* و تریپانوزوما کروزه‌ای *(T. cruzei)* به‌راحتی تفکیک نمودند [۱۳].

در این مطالعه با استفاده از PCR جایگاه‌های (Loci) حلقه‌های کوچک ژنوم سیتوپلاسمیک کینتوپلاست و دو جایگاه هسته‌ای شامل بخش‌های غیرقابل ترجمه ژن‌های ریبوزوم (ITS-rDNA) و ژن CPB ژنوم لیشمانیا آلودگی لپتومونادی، آلودگی به کمپلکس دنووانی و در نهایت تعیین هویت قطعی انگل‌های لیشمانیا دنووانی و لیشمانیا 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 کلانسُرا، حمزه‌خانلو و شاه‌تپه‌سی) و سه ایستگاه متغیر (روستاهای حِسی‌کندی، سَروآغاجی 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 به‌منظور 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 به‌دنبال آن استخراج DNA به‌روش تعدیل یافته آرانسای (Aransay) و همکاران انجام شد [۹]. در این روش علیرغم فرایند طولانی و شستشوهای 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 لیشمانیا (دونووانی) اینفانتوم (*L.d.infantum*) MHOM/FR/87/LEM1098 (AY896776) و سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) دونووانی (*L.d.donovani*) MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785) از طرف دکتر هاید استاد دانشگاه مونتپولیر (Montpellier University) فرانسه برای نویسندگان مقاله ارسال شد. از DNA پشه خاکی‌های نر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نشانگر (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت Fermentas آلمان به‌عنوان 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

محصول اولیه قطعه‌ای کوچک‌تر از روی قطعه بزرگ‌تر ساخته می‌شود. به این منظور از آغازگرهای طراحی شده توسط آرانسای و همکاران که برای انگل‌های لیشمانیا دونووانی، لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا آمازوننسیس *(L. amazonensis)*، لیشمانیا برازیلینسیس، لیشمانیا مکسیکانا محصولی به‌طول ۷۲۰ جفت‌باز و برای انگل‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اتیوپیکا *(L. aethiopica)* محصولی به‌طول ٦٥٠ جفت‌باز ایجاد می‌نماید، استفاده شد [۹].

۲-٤- واکنش‌های PCR جایگاه ITS-rDNA

برای تعیین هویت انگل‌های لیشمانیا 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 لیشمانیا تکثیر

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

نام آغازگر	جایگاه هدف	توالی 3'-5'	آغازگر (میکرومول)	dNTPs (میکرومول)	DNA (میکرومول)	اتصال آغازگر (زمان و درجه سانتی‌گراد)	حجم (میکرومول)	چرخه‌ها
LINR4	kDNA	GGGGTTGGTGTAAAATAGGG	۱	۲۰۰	۱	۳۰/۵۲ ثانیه	۱۰	۱۷
LIN17		TTTGAACGGGATTTCTG	۰/۲					
LIN19		CAGAACGCCCCTACCCG	۱	۲۰۰	–	۳۰/۵۸ ثانیه	۹۰	۳۳
IR1	rDNA-ITS	GCTGTAGGTGAACCTGCAGC-AGCTGGATCATT	۱	۲۵۰	۱	۳۰/۵۸ ثانیه	۲۰	۳۷
IR2		GCGGGTAGTCCTGCCAAACA-CTCAGGTCTG	۱					
LinfRR	CPB	CGTGCACTCGGCCGTCTT	۱/۳	۱٦۰	۲	۱/٦۱ دقیقه	۳۰	۳۰
LinfFF		CGTGACGCCGGTGAAGAAT	۱/۳					

جدول ۲ مشخصات ۱٥٦۹ 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 لیشمانیایی. ماده‌های گونه چایننسیس گروپ (*Chinensis group*) از هم قابل تفکیک نیستند در حالی‌که 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.

ماده‌ها				نرها		
گونه	تعداد	درصد	نمونه مثبت	گونه	تعداد	درصد
فلبوتوموس پرفیلیوی	۹٥٤	٦۰/۸۰	۹	فلبوتوموس پرفیلیوی	۱۱٤٥	٦۰/۹۷
-----	---	---	---	فلبوتوموس توبی (*P. tobbi*)	٥۲	۲/۷۷
چایننسیس گروپ	۱۳۱	۸/۳٥	۱	فلبوتوموس برویس	٦٦	۳/٥۱
				فلبوتوموس هالپنسیس	٥	۰/۲۷
				فلبوتوموس لانگی‌داکتوس	۱	۰/۰٥
فلبوتوموس پاپاتاسی (*P. papatasi*)	٤۷	۳	۱	فلبوتوموس پاپاتاسی	۱٦۳	۸/۷۳
فلبوتوموس کاندلاکی	٤٥	۲/۸۷	۱	فلبوتوموس کاندلاکی	٦۳	۳/۳٥
فلبوتوموس سرژنتی (*P. sergenti*)	۳۲	۲/۰٥	۰	فلبوتوموس سرژنتی	۱٥۱	۸/۰٤
فلبوتوموس الکساندری	۱	۰/۰٦	۰	فلبوتوموس الکساندری	٥۲	۲/۷۷
فلبوتوموس مونگولنسیس (*P. mongolensis*)	۱	۰/۰٦	۰	فلبوتوموس مونگولنسیس	٥	۰/۲۷
سرژنتومیا دنتاتا (*S. dentata*)	۳۱۳	۱۹/۹٥	۲	سرژنتومیا دنتاتا	۲۷	۱/٤۳
سرژنتومیا سینتونی (*S. sintoni*)	٤٤	۲/۸	۰	سرژنتومیا سینتونی	۱٤۲	۷/٥٦
سرژنتومیا پالووسکی (*S. pawlowsky*)	۱	۰/۰٦	۰	سرژنتومیا پالووسکی	۰	۰
جمع	۱٥٦۹	۱۰۰	۱٤	**جمع**	۱۸۷۸	۱۰۰

می‌نماید. این آغازگرها اختصاصی جنس لیشمانیا بوده و قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۱ کیلو جفت‌باز ایجاد می‌نمایند [۱٤].

۲-۵- واکنش‌های PCR جایگاه CPB

در این مطالعه برای شناسایی مستقیم انگل لیشمانیا اینفانتوم از آغازگرهای هاید و همکاران (۲۰۰٦) استفاده شد. این آغازگرها اختصاصی اعضای کمپلکس دونووانی بوده و قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۷۰۲ جفت‌باز برای لیشمانیا اینفانتوم (کپی E ژن) و ۷٤۱ جفت‌باز برای لیشمانیا دنووانی (کپی F ژن) ایجاد می‌نمایند [۱۳].

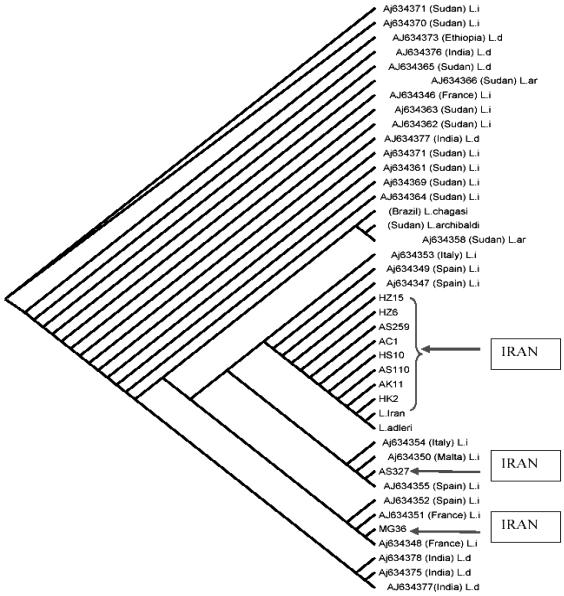
مشخصات آغازگرهای مورد استفاده، اجزاء و مقادیر مورد نیاز واکنش‌ها و برنامه حرارتی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

۲-٦- تعیین توالی و آنالیز توالی‌ها

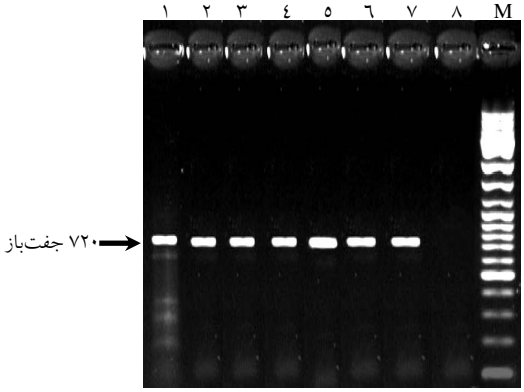
محصول PCR بخش‌هایی از جایگاه‌های ITS و CPBs برای تعیین توالی به شرکت Seqlab آلمان ارسال شد. برای اطمینان از صحت توالی نمونه‌ها و میزان مشابهت آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژنی، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Blast (www.ncbi.nih.gov.org/blast) بررسی شدند. به‌منظور بررسی روابط فیلوژنیک نمونه‌ها از آلگوریتم Maximum Parsimony موجود در نرم‌افزار Phylip تعبیه شده در برنامه ClustalW استفاده شد و درخت‌های فیلوژنی (کلادوگرام: 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 سرژانتومیاها (*Sergentomyia*) و ۱۰ گونه از فلبتوموس‌ها) پشه خاکی وجود دارد (جدول ۲). به‌نظر می‌رسد که فلبوتوموس پرفیلیوی ترانس‌کوکازیکوس (*P. perfiliewi transcaucasicus*) با وفور تقریبی ٦۱ درصد و میزان آلودگی ۰/۹٤ درصد، ناقل اصلی کالاآزار (Kala-azar) در منطقه گرمی استان اردبیل باشد.



نمودار ۱ درخت فیلوژنی (کلادوگرام) حاصل از مقایسه ۵۳٤ جفت‌باز توالی‌های ITS2 نمونه‌های لیشمانیا 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 لیشملنا دونووانی و L.i معرف لیشمانیا اینفانتوم است.

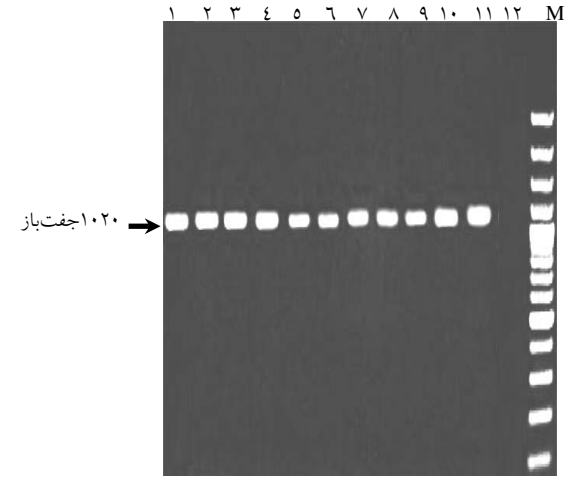


شکل ۱ محصول PCR بخش حلقه‌های کوچک kDNA لپتومونادهای داخل معده پشه خاکی‌های منطقه گرمی اردبیل. **ستون‌های ۱-۵:** نمونه‌های پشه خاکی‌های آلوده؛ **ستون ٦:** سویه استاندارد لیشمانیا(دونووانی)دونووانی MHOM/ET/00/HUSSEN: (AY896785)؛ **ستون ۷:** سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) اینفانتوم (AY896776) MHOM/FR/87/LEM1098؛ **ستون ۸:** کنترل منفی (پشه خاکی نر) و **M:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی Fermentas.

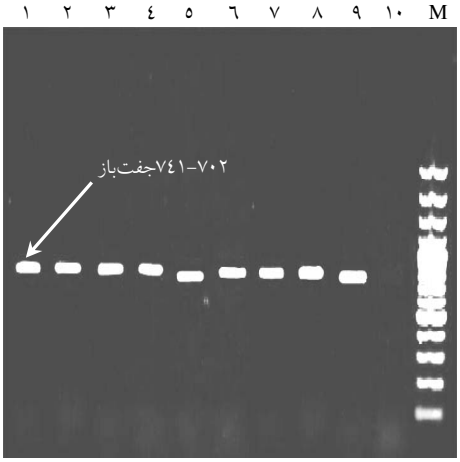
از بین ۱٤۰۰ پشه خاکی ماده بررسی شده توسط روش Semi-nested PCR از طریق جایگاه کینتوپلاست، ۱٤ نمونه مثبت و آلوده به لپتومونـاد مشاهده شد که محصول واکنش در حدود

۷۲۰ جفت‌باز ایجاد شد (شکل ۱). این آلودگی لپتومونادی می‌تواند مخلوطی از انگل‌های لیشمانیا دونووانی، لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا تروپیکا و سارولیشمانیا (*Sauroleishmania*) (لیشمانیا خزندگان) باشد. از مجموع ۱٤ 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 دونووانی 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 دونووانی بوده و ۹۹–۱۰۰ درصد مشابه با نمونه‌های جنوب اروپا (اسپانیا، ایتالیا و فرانسه) هستند (نمودار ۱). به هرحال به‌علت مشابهت بسیار بالای اعضای کمپلکس براساس این ژن نمی‌توان مشخص نمود که نمونه‌های ایران متعلق به کدام عضو کمپلکس دونووانی هستند.

برای تعیین هویت ۱۱ نمونه فوق، واکنش PCR برای ژن CPB انجام و تنها ۷ عدد از نمونه‌ها به‌طور 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 (دونووانی) اینفانتوم (AY896776) MHOM/FR/87/LEM1098؛ **ستون ۱۱:** سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) دونووانی MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785)؛ **ستون ۱۲:** کنترل منفی (پشه خاکی نر) و **M:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی Fermentas.

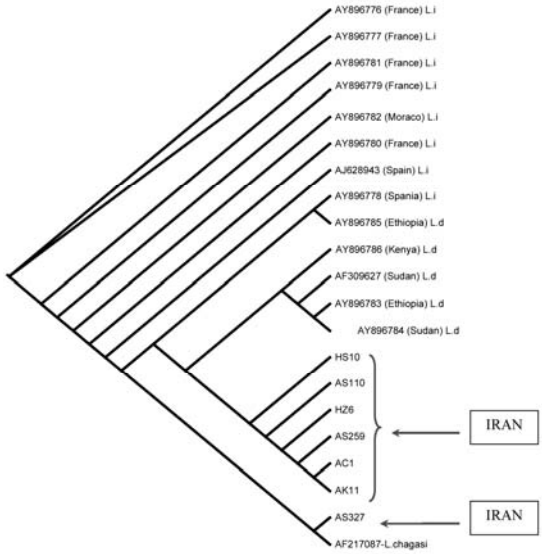


شکل ۳ محصول PCR بخشی از ژن CPB کمپلکس لیشمانیا دنووانی داخل معده پشه خاکی‌های منطقه گرمی اردبیل. **ستون ۱:** سویه استاندارد لیشمانیا (دونووانی) دونووانی MHOM/ET/00/HUSSEN (AY896785)؛ **ستون‌های۲–٤ و ٦–۸:** لیشمانیا دنووانی به‌طول ۷٤۱ جفت‌بازی یافت شده در بدن پشه‌خاکی‌ها؛ **ستون‌های ٥ و ۹:** به‌ترتیب مربوط به لیشمانیا اینفانتوم یافت شده در این مطالعه (ایران) و اینفانتوم استاندارد لیشمانیا (دونووانی) اینفانتوم MHOM/FR/87/LEM1098 (AY896776) به‌طول ۷۰۲ جفت‌باز؛ **ستون ۱۰:** کنترل منفی (پشه‌خاکی نر) و **M:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت Fermentas.

این ژن دارای دو کپی E (لیشمانیا(دونووانی)اینفانتوم) و F (لیشمانیا(دونووانی)دونووانی) 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(دونووانی)اینفانتوم (کپی E) عامل بیماری کالاآزار تیپ مدیترانه‌ای و ٦ مورد بقیه گونه لیشمانیا(دونووانی)دونووانی (کپی F) عامل بیماری کالاآزار تیپ سودانی است. بدین ترتیب در منطقه گرمی استان اردبیل یا کانون لیشمانیوز احشایی شمال غرب کشور به‌صورت همزمان هر دو عضو کمپلکس دونووانی 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 ٦ نمونه کپی‌های F مشاهده شد. بررسی

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



نمودار ۲ درخت فیلوژنی (کلادوگرام) حاصل از مقایسه ٦٧٠ جفت‌باز از توالی‌های ژن CPBs نمونه‌های لیشمانیا دونووانی 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 لیشمانیا دونووانی و L.i معرف لیشمانیا اینفانتوم است.

٤- بحث

کنترل بیماری لیشمانیوز در مناطق بومی، نیازمند آگاهی از اکولوژی و اپیدمیولوژی انگل، میزبان مخزن و نیز ناقل بیماری دارد. در این راستا شناسایی مخازن و جستجوی ناقلان آلوده یکی از مشکلات اساسی مسئولین کنترل بیماری محسوب می‌شود. یافتن پشه خاکی‌های آلوده به انگل، گامی اساسی در شناسایی گونه‌های ناقل و نیز پتانسیل انتقال بیماری در مناطق بومی است. به لحاظ پایین بودن آلودگی انگلی در اغلب کانون‌های لیشمانیوز احشایی یافتن لپتوموناد در بدن پشه خاکی‌هایی که تمایل زیاد به خونخواری از انسان (آنتروپوفیل :Anthropophilic sandflies) دارند کافی است که آن را به‌عنوان ناقل احتمالی بیماری معرفی نماید [۹]. در این مطالعه پشه خاکی‌های فلبوتوموس پرفیلیوی ترانس‌کوکازیکوس با وفور تقریبی ٦١ درصد و میزان آلودگی حدود ۱ درصد نقش اصلی انتقال کالاآزار را در منطقه گرمی به‌عهده دارند و مبارزه هدفمند با این گونه می‌تواند منجر به کنترل بهتر و مؤثر بیماری شود.

در مطالعات مختلف بسته به هدف مطالعه از بخش‌های مختلف ژنوم انگل استفاده می‌شود. در این مطالعه برای بررسی اولیه و تعیین آلودگی لپتومونادی از بخش حلقه‌های کوچک کینتوپلاست که تعداد آن ۱۰۰۰۰ مولکول در هر سلول بوده و به‌صورت شبکه‌ای به هم تابیده دیده می‌شود 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 گونه‌های مختلف لیشمانیا در حدود ٦٠٠-٨٠٠ جفت‌باز است و از آن در تفکیک گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا استفاده می‌شود [۱۲]، ولی این تغییرات در بین افراد گونه هم گزارش شده است بنابراین تعیین توالی این بخش مشکل بوده و برای تعیین هویت گونه‌ها سودمند نخواهد بود.

در این مطالعه به‌منظور تعیین هویت انگل‌ها (نمونه‌های مثبت شده از طریق حلقه‌های کوچک کینتوپلاست)، از توالی بخشی از ITS ژن rDNA که در گونه‌های مختلف متغیر است استفاده شد [۱۵]. این ژن در تعیین هویت گونه‌ها کاملاً مناسب است ولی در سطح کمپلکس دونووانی کارایی چندانی ندارد. شونیان (Schonian) و همکاران نشان دادند که بخش ITS انگل‌های متعلق به کمپلکس دونووانی در مقایسه با سایر لیشمانیاها چندشکلی (Polymorphism) کمتری دارند [١٦]. نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های بخش ITS ژن rDNA موجود در بانک ژنی نشان می‌دهد که این بخش از ژنوم در تفکیک اعضای کمپلکس دونووانی حساسیت لازم را ندارد. با وجود تفاوت در میکروساتلایت‌های (Microsatellites) این ژن در اعضای کمپلکس دونووانی که در بخش ITS1 حدود ۲/۹ درصد و در ITS2 حدود ۲/۳ درصد است، این تفاوت‌ها قابل اعتماد نبوده و حتی در یک گونه مشخص نیز پراکندگی ثابتی ندارند. براساس مطالعات فیلوژنی کالس (Kuhls) و

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 به‌راحتی 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 به‌نظر می‌رسد ژن CPB به‌واسطه اهمیت بسیار زیاد در بیماری‌زایی و خصوصیات آنتی‌ژنیکی متفاوتی [۱۸] که در گونه‌های مختلف ایجاد می‌نماید درخت‌های فیلوژنی 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 به‌صورت 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] به‌نظر 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 SGS06/77، T5/72/6، TDR6/36 است که با پشتیبانی مالی سازمان بهداشت جهانی (WHO) و دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

٦- 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_epidmi-ology /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] Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi 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, Mohebali 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, Vatandoost H, Motazedian H, Azizi K, Mohebali 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] Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2004; 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.