مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۳ و ٤: از ٦٥-۷۳
پاییز و زمستان ۱۳۸٦

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

ناصح ملکی[۱]، عزت‌الدین جوادیان[۲]، مهدی محبعلی[۳]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[٤]، جاوید صدرایی[٥]

ذبیحا.. زارعی[٦]، محمدعلی عشاقی[۷*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه حشره‌شناسی پزشکی ومبارزه 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 ومبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۶

چکیده

هدف: در این مطالعه حشره‌شناسی برای تعیین پشه خاکی‌های ناقل لیشمانیا، تعداد ۳۵۸ پشه خاکی متعلق به جنس سرژنتومیا 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 سرژنتومیا 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 ۷٦ درصد با لیشمانیا (سارولیشمانیا) آدلری مشابهت دارد. با این‌حال برای تعیین هویت نهایی آن‌ها باید مطالعات بیشتری صورت پذیرد. از نکات جالب توجه این‌که در این مطالعه یک عدد پشه خاکی گونه سرژنتومیا 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. گلیکواینوزیتول فسفولیپید ساختاری است که در این نوع انگل‌ها وجود داشته و با سرم بیماران کالاآزاری، کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی ایجاد می‌نماید. به‌علت شباهت آنتی‌ژنیکی این نوع انگل‌ها و انگل‌های لیشمانیای آلوده‌کننده پستانداران، در بررسی‌های سرولوژیک امکان گزارش مثبت‌های کاذب کالاآزار 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 سرژنتومیاها 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: ٦٤٤٦-١٤١٥٥
Email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

کـه حـدود ۲۰ گونـه آن اهمیـت پزشـکی و دامپزشـکی دارنـد. انگل‌های لیشمانیا سـه نـوع بیمـاری جلـدی، جلـدی- مخـاطی و احشایی را در انسان ایجاد می‌نمایند و تنها راه انتقال قطعی بیمـاری، گـزش پـشه خـاکی‌هـای فلبتومینـه (Phlebotomine sandflies) آلوده است [۲]. تاکنون ۷۰۰ گونه فلبتومینه شناسایی شـده کـه تنها ۱۰ درصد آن‌ها توانایی انتقال ۳۰ گونه انگل را دارنـد [۳]. براساس محل تکامل انگل‌های لیـشمانیا در معـده پـشه خـاکی ناقـل، سـه زیـرجنس مختلـف لیـشمانیا، ویانیـا (*Viannia*) و سارولیشمانیا (*Sauroleishmania*) شناسایی شده [٤] که ایـن تقسیم‌بندی بعداً براساس فیلوژنی توالی‌های DNA مورد تأییـد قرار گرفته اسـت [٦،٥،٢]. پـشه خـاکی‌هـای مـاده انگـل‌هـای لیشمانیا را در حین خونخـواری مـی‌بلعنـد و بـا تغییـر شـرایط محیطـی از جملـه کـاهش دمـا و افـزایش pH آماسـیتگوت (Amastigote) بـه پروماسـتیگوت (Promastigote) تبـدیل می‌شود [۷،۲]. ایـن تغییـر و تبـدیل در قـسمت‌هـای مختلـف دستگاه گـوارش پـشه خـاکی ناقـل صـورت مـی‌گیـرد کـه در زیرجنس‌های لیشمانیا، ویانیا و سارولیشمانیا به‌ترتیب در بـالای دریچـه پیلـور (Suprapylarian) بـالا و پـایین دریچـه پیلور (Peripylarian) و زیر دریچـه پیلـور (Hypopylarian) انجام می‌شود. سارولیـشمانیا زیرجنـسی از لیـشمانیا اسـت کـه برای انسان بیماری‌زا نبـوده و بـه عنـوان لیـشمانیوز مارمولـک (Lizard Leishmaniasis) شناخته شده است [۸]. تا بـه‌حـال چندین گونه از لیـشمانیای خزنـدگان ماننـد لیـشمانیا داویـدی (*L.davidi*)، لیـشمانیا پروماسـتیگوت (*L.promastigotae*)، لیشمانیا آدلری (*L.adleri*)، لیشمانیا تارنتولا (*L.tarentolae*)، لیشمانیا چـاملئونیس (*L.chameleonis*) و لیـشمانیا هنریـسی (*L.henrici*) در نقاط مختلف دنیا گزارش شده اسـت [۹]. در کشور ایران نیز گونه لیشمانیا پروماستیگوت گزارش شده است [۹-۱۲]. لیشمانیا آدلری برای اولـین بـار در کنیـا از مارمولـک لاتاسـتیا لانگیکاداتـا (*Latastia longicadata*) جـدا و نامگذاری شد [۱۳].

قبلاً این زیرگونه وضعیت تاکسونومیکی مشخصی نداشـت و گاهی در داخل و گاهی خارج جـنس لیـشمانیا و گـاهی نیـز بـه‌عنـوان اجـداد جـنس لیـشمانیا و بـه صـورت گـروه اولیـه (Primitive Group) شناخته می‌شد. مطالعات اخیر بـر مبنـای تـوالی‌هـای DNA، نـشان داده اسـت کـه ایـن زیـرجنس از گروه‌هـای ثانویـه گونـه‌هـای آلـوده‌کننـده پـستانداران هـستند [۵، ١٤-١٦]. برخلاف سـایر لیـشمانیاها در مـورد ایـن گـروه مطالعـات کمتـری انجـام شـده اسـت. چرخـه تکـاملی آن‌ها به صورت زیر دریچه پیلور اسـت. البتـه ادعاهـایی مبنـی بر تکامل آن‌ها در بخش‌های جلوتر معـده میـانی پـشه خـاکی نیز وجود دارد [۱۸،۱۷]. ناقل ایـن انگـل‌هـا پـشه خـاکی‌هـای جنس سرژنتومیا (*Sergentomyia*) هستند که اغلب در دنیـای قـدیم پراکنـده بـوده و روی خزنـدگان تغذیـه مـی‌نماینـد [۱۰،۹]. مانند سایر لیشمانیاها پروماسیتگوت‌ها به همـراه خـون خورده شده در داخل پرده دور غذا (Peritrophic Matrix) به دام می‌افتند. در سرژنتومیا برخلاف فلبتوموس (*Phlebotomus*) و لوتزومیا (*Lutzomyia*) «پرده دور غـذای» ضـخیم‌تـری ایجـاد می‌شود که ممکن اسـت یکـی از دلایـل عـدم تکامـل ایـن انگل‌ها در قسمت جلویی معده میانی باشـد [۲۰،۱۹] و بـه همین علت انگل‌ها به معده عقبی رانده می‌شـوند و احتمـالاً مکانیزم انتقال آن‌ها از طریق دفـع انگـل در حـین خونخـواری است که در محل زخم، شکاف جلد یا سطوح مخاطی (به علت مالش جلد آلوده به آن‌ها) صورت می‌گیرد. پدیده پیش از دفـع (Prediuresis) که در حین تغذیه روی میزبان به‌منظور تغلـیظ خون خورده شده روی می‌دهد، مکانیزم انتقال از طریق دفـع را تسهیل می نماید [۲۱]. تصور عمومی در انتقال این انگل‌ها بـه این صورت است که تغذیه خزندگان از پشه خاکی‌هـای آلـوده باعث انتقال آن‌ها می‌شود [۲۲]. پشه خاکی‌ها نیز انگل‌هـا را در حین گردش مخاط سطحی دستگاه گوارش خزندگان دریافـت می‌نمایند [۲۱].

روش‌های تشخیـصی مختلفـی ماننـد روش کـشت انگـل، تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی، بررسی میکروسکوپی، بررسی سرولوژیکی مبتنی بر جستجوی آنتی‌بادی‌ها، تـشخیص از طریـق ناقـل اسـتریل (Xenodiagnosis) و در نهایـت روش‌های مولکولی مبتنی بـر DNA بـرای تـشخیص بیمـاری لیشمانیوز و شناسایی انگل وجـود دارد. از بـین ایـن مـوارد دو روش کلاسیک، برای تخمین میزان آلـودگی میزبـان، مخـزن و حشرات ناقل به‌کار می‌روند که شامل بررسی‌های میکروسکوپی و جداسازی انگل از طریق کشت هستند. هر دوی این روش‌ها

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

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 کلانسرا، شاه‌تپه‌سی و حمزه‌خانلو به‌عنوان ایستگاه ثابت و سه روستای حسی‌کندی، قاسم‌کندی و سروآغاجی به عنوان 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 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 تئودور- مثقالی 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 کینتوپلاست (kDNA Minicircle) برای تعیین آلودگی لپتومونادی در پشه خاکی‌ها استفاده شد. به‌لحاظ فراوانی حلقه‌های کوچک موجود در DNA کینتوپلاستی (kDNA)، بررسی اولیه آلودگی پشه خاکی‌ها با استفاده این قسمت از ژنوم بسیار آسان و کارآمد است.

در واکنش Semi-nested PCR، در مرحله اول از آغازگر (Primer) جلویی LINR4 (Forward) (5′-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3′)، و آغازگر برگشتی LIN17 (Reverse) (5′-TTTGAACGGGATTTCTG -3′) و در مرحله دوم فقط از آغازگر برگشتی LIN19 (5′-CAGAACGCCCCTACCCG-3′) استفاده شد. در مرحله اول واکنش در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر بافر ۱X *Taq* پلیمراز، ۱ واحد *Taq* (Unit) پلیمراز، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار dNTPs، ۱ میکرومول

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

LINR4 و ۰/۲ میکرومول LIN17 و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده استفاده شد. چرخه حرارتی مرحله اول واکنش به‌صورت ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و ۱۷ چرخه متوالی شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه است که بعد از اتمام چرخه‌ها در نهایت واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 ۹٤ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه که با ۳۳ بار تکرار و نگهداری نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام واکنش ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگازر ۱/۲ درصد الکتروفورز شد.

۲-٤- تکثیر rDNA در نمونه‌های مثبت شده

به‌لحاظ تنوع ژنتیکی حلقه‌های کوچک kDNA لیشمانیا، تعین 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 ribosomal DNA (rDNA) 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 کوپولیلو (Cupolillo) (۱۹۹۵) معرفی شد استفاده گردید [۲٦]. توالی آغازگر جلویی IR1 به‌صورت 5′-GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA (GCT GGA TC -3′) و آغازگر برگشتی IR2 به‌صورت 5′-GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA (GGT CTG -3′) است. در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر از واکنش بافر ۱X *Taq* پلیمراز، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ٦۰ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۱ میلی‌مولار از هر آغازگر،۱ واحد *Taq* پلیمراز و ۱ میکرولیتر از DNA نمونه استفاده شد. بعد از اتمام واکنش محصول PCR روی ژل آگازر 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.org/blast) مقایسه شدند [۲۷].

۳- نتایج

در مطالعه بررسی ناقلین کالاآزار در منطقه گرمی استان اردبیل، در مجموع ۳٤٤۷ 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، ۱٦۹ نمونه آن نر و ۳۵۸ نمونه آن ماده بودند (جدول ۱). نتایج مطالعه ریخت‌شناختی سرژنتومیاها بیانگر حضور سه گونه سرژنتومیا دنتاتا (*S. dentate*)، سرژنتومیا سینتونی (*S. sintoni*) و سرژنتومیا پاولووسکی (*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 کینتوپلاست مثبت شد که ناقل هر دو لپتومونناد سرژنتومیا دنتاتا شناسایی شد. یکی از این پشه خاکی‌ها از اماکن طبیعی روستای حسن‌کندی 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 ۷٦ 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.

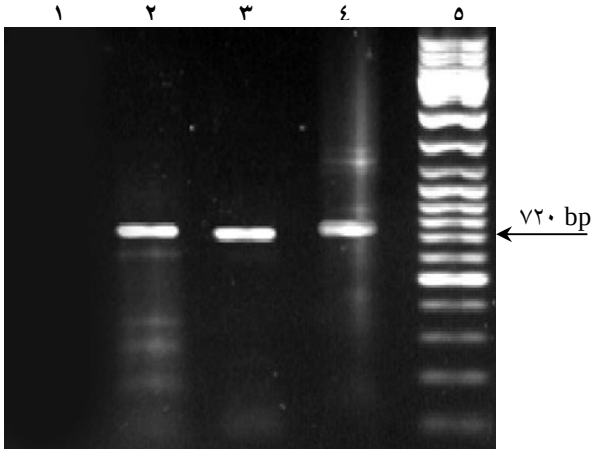
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

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

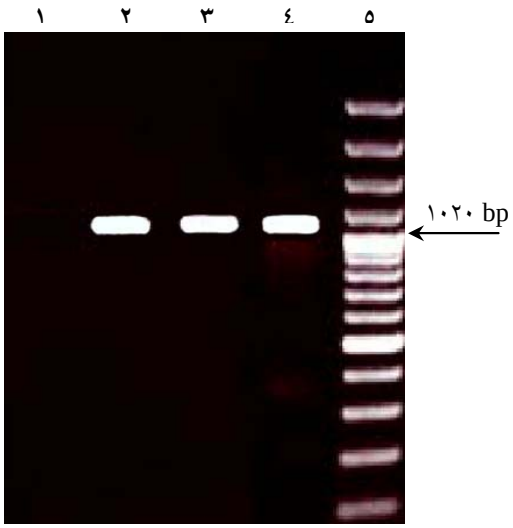
گونه	نر						ماده						جمع کل
	اماکن						اماکن						
	حیوانی	انسانی	دست‌ساز	طبیعی	جمع		حیوانی	انسانی	دست‌ساز	طبیعی	جمع		
سرژنتومیا دنتاتا	–	–	۱	۲۶	۲۷		۱۸	۳۱	۶۳	۲۰۱	۳۱۳		۳۴۰
سرژنتومیا سینتونی	۲۴	۱۴	۱۵	۸۹	۱۴۲		۲۰	۱۱	۸	۵	۴۴		۱۸۶
سرژنتومیا پاولووسکی	–	–	–	–	–		–	–	۱	–	۱		۱
جمع	۲۴	۱۴	۱۶	۱۱۵	۱۶۹		۳۸	۴۲	۷۲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

۴- بحث

لیشمانیوز مارمولک که در بین بعضی از انواع مارمولک‌ها دیده می‌شود به‌هیچ 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 می‌یابد. در ایران مارمولک‌های آلوده از خراسان، خوزستان و منجیل صید شده‌اند. در خراسان مارمولک‌های آگاما ملانورا (*Agamae 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 سینتونی است که از لانه مارمولک‌های آلوده خراسان صید شده است. در ترکمن‌صحرا، لطف‌آباد و خوزستان سرژنتومیا سینتونی صید شده، آلودگی لپتومونادی بیشتری نشان داده است. خون معده این پشه خاکی‌ها حاوی گلبول‌های هسته‌دار گزارش شده که بیانگر تغذیه از مارمولک است [۳۰،۱۱،۱۰]. در ایران آلودگی طبیعی علاوه بر سرژنتومیا سینتونی 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).



شکل۲ الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر بخش ITS-rDNA. **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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

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.) gymnodactiyli*) را به‌عنوان عامل بیماری از ایران معرفی کرده‌اند [۳۰].

جنس سرژنتومیا وضعیت چندان مشخصی ندارد. بعضی از زیرجنس‌های آن مانند سینتونیوس (*Sintonius*) مشخصات حدواسط جنس فلبتوموس را نشان می‌دهند. در عوض پیوستگی خیلی زیادی با لوتزومیاهای 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 سینتونیوس هم قادر به گزش انسان هستند [۳]. سرژنتومیا کلایدی که حریصانه 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 گلیکواینوزیتول فسفولیپیدهایی (Glycoinositol Phospholipids: GIPLs) مشابه با لیشمانیای پستانداران دارد که ٤ جزء اصلی آن‌ها شناسایی شده است. براساس این چهار GIPL ارتباط فیلوژنیکی نزدیکی، بین لیشمانیاهای پستانداران ومارمولک 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 علت زیرجنس سارولیشمانیا را برای این انگل‌ها پیشنهاد نمودند [۳۳،۳۲]. انگل‌های مارمولک ارگانیسم‌های مفیدی در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و بیوشیمی جنس لیشمانیا هستند چرا که در آزمایشگاه بدون هیچ خطری به‌راحتی نگهداری می‌شوند [۱٤،۳۲]. واکنش متقاطع 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 کالاآزاری کمپلکس قوی آنتی‌ژن- آنتی‌بادی را تشکیل می‌دهد [۳٤]. لیشمانیا آدلری و لیشمانیا تارنتولا 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 [۳٦].

لیشمانیا تارنتولا به‌عنوان یک واکسن زنده می‌تواند در برابر لیشمانیا (لیشمانیا) دونووانی ایمنی‌زا باشد. بنابراین مسیر جدیدی در ابداع واکسن‌های 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 کالاآزار احتمالاً به علت حضور این انگل‌ها است [۳۹،۲۵].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

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. Spsp. 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

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] WilsonVCLC, 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. Parasite1997; 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, Saf'ianova VM, Ovezmu-khammedov A. [An experimental study of the interrelations of Leishmania (Sauroleishmania) gymnodactyli and the sandfly Sergentomyia arpaklensis (Diptera: Phlebotominae)]. Parazitologiia. 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 Phlebtomine of Iran. 1964; J Med Entomol. 1964; 285-300.

[23] Adini I, Jacobson RL, Kasp M, Schlein Y, Jaffe CL. Species Species-Specific specific Detection detection of Leishmania in Sand Flies sandflies Using using an Enzymeenzyme-Linked linked Immunosorbent immunosorbent Assayassay. 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 detection of Leishmania spp in E experimentally Insect insect Individual individual Phlebotomine phlebotomine Sand sandFflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae),). Rev Inst Med Trop Sao S 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.org/blast

[28] Bray RS. Leishmania. Ann Rev Microbiol 1974; 28: 189-217.

[29] Lewis DJ, Ward RD. Thansmission and vectors. In: the leishmaniases 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, Mohebali M. natural 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 occurance in Sergentomyia dentata in Ardebile province, northwest of Iran,. Ir J Publ Hlth. 1997; 26 (1-2): 7-12.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

[32] Saf'janova 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, Jones1 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]