Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۴ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۵ ، صفحات : ۴۸- ۳۹

فلبوتوموس (پارافلبوتوموس) الکساندری، ناقل احتمالی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در جنوب ایران

کوروش عزیزی: دانشجوی دوره دکترا، گروه حشره شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان
دکتر یاور راثی: دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علومزشکی تهران – نویسنده رابط : rassiy@sina.tums.ac.ir
دکتر محمدحسین معتضدیان: دانشیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
دکتر عزت الدین جوادیان: استاد، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمدرضا یعقوبی ارشادی: استاد، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
مهندس سینا رفیع زاده : کارشناس ارشد، گروه ژنتیک انسانی، اداره ژنتیک، مرکز مدیریت بیماریها
دکتر مهدی محبعلی: استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر غلامرضا حاتم: دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دریافت : ۱۳۸۴/۴/۳ **پذیرش** : ۱۳۸۵/۲/۴

چکیده :

زمینه و هدف: یکی از مهمترین بیماریهای انگلی که از نظر صدمات انسانی و پی آمدهای اقتصادی بسیار حائز اهمیت می باشد، لیشمانیوز است که طیف وسیعی از تظاهرات کلینیکی را از آسیبهای پوستی تا ناراحتی های احشایی منجر به مرگ ، در بر می گیرد. کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه ای است که غالباً در کودکان زیر ۱۰ سال مشاهده می گردد. در حال حاضر شایعترین کانونهای بیماری در ایران در بخشهایی از استانهای اردبیل، فارس، آذربایجان شرقی، بوشهر و قم وجود دارد. این مطالعه بمنظور تعیین ناقلین بیماری کالاآزار در بخش ماهورمیلاتی، شهرستان ممسنی واقع در استان با استفاده از دو روش میکروسکپیک و Semi Nested-PCR فارس انجام شده است.

روش کار: این مطالعه جزء مطالعات علوم پایه و از نوع مطالعات بنیادی کاربردی می باشد که به روش مقطعی در طی سالهای ۸۴-۱۳۸۳ انجام شده است. نمونه گیری از پشه خاکیها بوسیله تله های چسبان، تله های نوری و آسپیراتور انجام شد. پشه خاکیهای ماده پاروس و خالی از گونه های مشکوک به انتقال بیماری پس از تعیین هویت، در فرایند استخراج DNA و جستجو برای تشخیص انگل لیشمانیا در تکنیک Semi Nested- PCRبا استفاده از پرایمرهای اختصاصی kDNA (LIN R4 - LIN17- LIN19) قرار گرفتند. تعدادی از نمونه ها نیز بمنظور مشاهده آلودگی لپتومونایی تشریح گردیدند.

نتایج: در مجموع ۱۲۶۸۸ پشه خاکی متشکل از ۲۵ گونه صید گردید که از این میان گونه *فلبوتوموس (پارافلبوتوموس) الکساندری* با ۲۲۰۰ نمونه صید شده (۱۷/۳۴٪) دومین گونه غالب منطقه بود. تعداد ۱۲۰ نمونه ماده از این گونه، ۵۰ نمونه از هر یک از دو گونه *فلبوتوموس(ف.) پاپاتاسی و ف. سرژانتی* و نیز ۲۴ نمونه از گونه ماژور مورد بررسی آلودگی به لیشمانیا با استفاده از روش Semi Nested-PCR قرار گرفت که تنها در ۵ مورد (۴/۱۷٪) از نمونه های *ف. الکساندری* آلودگی به گونه *لیشمانیا اینفانتوم* مشاهده گردید. از میان نمونه های تشریح شده نیز ۲ مورد آلودگی لپتومونایی در این گونه مشاهده گردید اندکس آنتروپوفیلیک این گونه با استفاده از روش ELISA ۳۲/۵ درصد تشخیص داده شد.

نتیجه گیری: با توجه به افزایش چشمگیر موارد بیماری در سالیان اخیر در ساکنین این بخش، آلودگی بسیار بالای سگها و روباه ، مشاهده آلودگی لپتومونایی در نمونه های تشریح شده گونه *فلبوتوموس الکساندری*، تعیین هویت گونه انگل جدا شده به عنوان *ل. اینفانتوم* با استفاده از روش مولکولی Semi Nested- PCR اختصاصی، این منطقه به عنوان یک کانون اندمیک جدید کالاآزار در جنوب کشور معرفی شده وبه نظر میرسد گونه *ف. الکساندری* بعنوان ناقل بیماری در این کانون ودومین ناقل قطعی (Proven Vector) کالاآزار در ایران باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز احشایی، *فلبوتوموس الکساندری*، *لیشمانیا اینفانتوم*، ناقل احتمالی، جنوب ایران

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

مقدمه :

لیشمانیوز از جمله بیماریهای مشترک بین انسان و حیوان است (Zoonosis) که به چهار فرم اصلی جلدی (سالک)، جلدی مخاطی، جلدی منتشر و احشایی (کالاآزار) دیده می شود (اردهالی و همکاران ۱۳۷۳). در میان بیماریهای منتقله بوسیله حشرات، لیشمانیوز پیچیده ترین و وسیعترین طیف را دارد چرا که مجموعه ای متشکل از بیش از ۲۰ گونه انگل لیشمانیا، مخازن مختلف و ناقلین متعدد را شامل شده و در کانونهای توپوگرافیک بسیار متنوعی وجود دارد (Peters W. and Killick-Kendrick R. 1987).

لیشمانیوز احشایی شدیدترین و خطرناکترین فرم بیماری است که بوسیله اعضاء کمپلکس *لیشمانیا دونوانی* ایجاد شده و مهمترین علائم کلینیکی آن عبارتند از کم خونی، تب نامنظم و اسپلنوهپاتومگالی (WHO 1990). کالاآزار در ۴۷ کشور جهان شیوع دارد. میزان بروز سالیانه آن ۵۰۰ هزار و مرگ ومیر سالیانه آن ۷۵۰۰۰ نفر است که عمدتاً در هند، سودان و برزیل اتفاق می افتد (WHO 2000) .

عامل بیماری تک یاخته ای از تاژکداران خونی و نسجی از جنس *Leishmania* است که انواعی از آن برای انسان بیماریزاست. ناقلین بیماری پشه خاکیهای فلبوتومینه از خانواده پسیکودیده هستند که از حدود ۷۰۰ گونه شناخته شده آنها، شواهد برای قطعی بودن ناقلیت ۱۹ گونه کافی است (۱۱ گونه فلبوتوموس در دنیای قدیم و ۸ گونه لوتزومیا در دنیای جدید). معیار معرفی شده برای معرفی یک گونه پشه خاکی به عنوان ناقل، ،انساندوست بودن آن و آلودگی طبیعی به همان گونه ای از انگل است که در همان محل از بیماران جدا شده است. مشاهده آلودگیهای طبیعی پشه خاکیها که پس از هضم خون هم دیده شود بیشتر حائز اهمیت است تا آلودگی در حضور خون خورده شده باشد(Alexander B. 2000).

وجود کالاآزار در ایران نخستین بار بوسیله پویا در سال ۱۳۲۸ از تنکابن گزارش گردید (پویا ۱۳۲۸). کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه ای است که غالباً در کودکان زیر ۱۰ ساله و عمدتاً در سنین ۲-۱ سال مشاهده میگردد (Edrissian Gh. et al.1999). در حال حاضر، شایعترین کانونهای بیماری در ایران، استانهای اردبیل (گرمی و مشکین شهر)، فارس (جهرم، فیروزآباد و قیروکارزین) ، آذربایجانشرقی (اهر و کلیبر)، بوشهر (دشتی و دشتستان) و قم (دهستان قاهان) می باشند و موارد اسپورادیک بیماری نیز در اکثر استانهای کشور گزارش می گردد(Edrissian Gh et al. 1993; Mohebali M. et al. 2001، فخار و همکاران ۱۳۸۳).

بر اساس شواهد اپیدمیولوژیک و مشاهده آلودگی لپتومونایی در نمونه های تشریح شده پشه خاکیها در مناطق اندمیک بیماری، سه گونه فلبوتوموس ماژور، ف. پرفیلیوی و ف. کشیشیانی بعنوان ناقلین احتمالی(Probable Vector) معرفی شده اند (Rassi Y. 1997; Sahabi Z. et al.1992; Seyedi-Rashti M.A. et al.1995..) اخیراً گونه ف. کاندلاکی به عنوان ناقل قطعی کالاآزار در کانون شمال غـــــربی ایران و در جهان معرفی شده است (Rassi Y. et al 2005).

مخازن بیماری در ایران، در درجه اول سگ و سپس سگ سانان وحشی از قبیل روباه ، شغال و گرگ می باشند (Mohebali M. et al. 2005)، هر چند که انگل عامل بیماری از جوندگان نیز جدا شده است (Mohebali M.et al.1998) .

روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) روشی بسیار حساس و دقیق برای شناسایی DNA انگل لیشمانیا در بدن پشه خاکیهای آلوده است. این روش ، تشریح پرزحمت و زمان بر پشه خاکیها را که مستلزم وجود میکروسکپیستهای ماهر و باتجربه است، غیر ضروری می سازد و در مطالعات اپیدمیولوژیک که تعداد بسیار زیادی از پشه خاکیها باید بطور همزمان مورد

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

بررسی قرار گیرند، بسیار مفید و کاربردی است (Aransay A.M. et al. 2000) . شهرستان نورآباد ممسنی در استان فارس در سالهای اخیر شاهد افزایش چشمگیر موارد کالاآزار بوده است که بیشتر موارد از بخش عشایرنشین ماهورمیلاتی بوده است، بطوریکه در سال ۱۳۸۱ تعداد موارد بیماری به ۸ نفر رسیده و بنظر میرسید کانون اندمیک جدیدی در این منطقه در حال شکل گیری است. لذا تحقیق حاضر بمنظور مطالعه و تعیین ناقلین و مخازن بیماری در این کانون نوظهور طراحی و طی سالهای ۸۴-۱۳۸۳ به انجام رسید که در این مقاله نتایج مربوط به ناقلین ارائه گردیده است.

روش کار :

این مطالعه از نوع مطالعات بنیادی کاربردی بوده و به روش مقطعی طی سالهای ۸۴-۱۳۸۳ انجام گرفته است. بر اساس آمار مرکز بهداشت استان فارس و شهرستان ممسنی، روستاهای میشان، بابامنیر، نزاع و مالچه شیخ از بخش ماهورمیلاتی که سابقه گزارش موارد بیماری را داشتند انتخاب و صید پشه خاکیها با استفاده از تله های چسبان(Sticky traps) ، تله های نوری مینیاتوری CDC و آسپیراتور انجام پذیرفت. نمونه ها پس از جداسازی از تله ها در لوله های حاوی اتانول ۷۰٪ به آزمایشگاه انتقال داده میشد. نمونه های ماده با استفاده از سوزنهای ظریف حشره شناسی و در زیر استریومیکروسکپ در یک قطره 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) تشریح ، سر و قطعات انتهایی شکم بر روی لامی حاوی یک قطره محیط پوری برای تعیین هویت بعدی منتقل و بقیه بدن نیز برای استخراج DNA مورد استفاده قرار میگرفت. تعیین هویت پشه خاکیها به روش ریخت شناسی (Morphology) و با استفاده از کلید پشه خاکیهای ایران انجام گرفت (Lewis D.J. 1982).

استخراج DNA به روش توصیه شده توسط معتضدیان و همکاران(Motazedian M.H. etal. 2002) با مختصری تغییرات انجام می شد. بطور خلاصه بدن هر پشه خاکی در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری بوسیله پیپـــــت پاستور استریل کاملاً له میشد. سپس به ایـــن فـــراورده ۲۰۰ میـــکرولیتر بافـــر هضم کننده (50 mM Tris-HCl (Ph,7.6) ; 1mM EDTA ; 1% Tween20) و ۱۲ میکرولیتر Proteinase K اضافه نموده و مخلوط حاصل یک شب در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده می شد. پس از اضافه نمودن ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل/کلروفرم/ایزوآمیل(۱:۲۴:۲۵ V/V/V)،در دور 10000rpm(دور در دقیقه)به مدت۱۰دقیقه سانتریفیوژ به عمل می آمد و محلول رویی حاوی DNA به کمک سمپلر به تیوب دیگری انتقال داده میشد. سپس ۴۰۰ مایکرولیتر اتانول خالص اضافه و مجدداً سانتریفیوژ می شد که باعث رسوب DNA میگردید. سپس DNA در انکوباتور خشک شده و نهایتاً با اضافه نمودن مقدار مناسبDDW تا زمان انجام PCR در یخچال نگهداری می گردید. تکثیر (Amplification) ناحیه متغیر (Variable area) مینی سیرکلهای کینتوپلاست لیشمانیا (kDNA)به روش توصیه شده توسط آرانسی و همکاران (۲۰۰۰) با مقداری اصلاحات انجام شد. در مطالعه حاضر از پرایمرهای زیر استفاده شد که از ناحیه محافظت شده (Conserved area) مینی سیرکلهای kDNA طراحی شده بودند (Aransay A.M. et al. 2000).

LIN R4: (Forward) 5′- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3′

LIN 17: (Reverse For 1st Round) 5′ - TTT GAA CGG GAT TTC TG-3′

LIN 19: (Reverse for 2nd Round) 5' – CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'

واکنش Semi Nested-PCR طی دو مرحله و با مشخصات زیر انجام گرفت:

PCR I:
- $MgCl_2$: 1 µl.
- dNTPs: 0.5 µl.
- PCR Buffer (1X): 2.5 µl.
- Primers (LIN R4 & LIN17): 2+2 µl.
- Taq DNA Polymerase: 0.2 µl.
- D.D.W. : 11.8 µl.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر(Corbett Research, CGI-96, Australia) انجام شد . ابتدا دناتوره شدن اولیه(Initial Denaturation) ۵ دقیقه طی حرارت۹۴ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت سپس فرایند ۳۰ چرخه متوالی ادامه یافت که هر چرخه شامل سه مرحله: ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون Denaturation)، ۵۲ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه(اتصال Annealing) و ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه (تکثیر Extension) بوده است و نهایتاً با قرار گرفتن در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه (Final Extension) تکثیر نهائی DNA انجام و تکمیل گردید. مفدار ۲ مایکرولیتر از محصول مرحله اول به عنوان Template برای مرحله دوم استفاده گردید. میزان مواد استفاده شده در این مرحله شبیه مرحله اول بود فقط پرایمر LIN19 جایگزین پرایمر LIN 17 گردید. برنامه حرارتی مرحله دوم به صورت زیر بود:

- Denaturation: 94˚C - 30S.
- Annealing: 58˚C - 30s.
- Extension: 72˚C - 1min.
- Final Extension: 72˚C - 10 min.

چرخه حرارتی مرحله دوم ۳۳ بار تکرار گردید.

برای آشکار سازی محصولات PCR ، مقدار ۵ مایکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ که با اتیدیوم بروماید مخلوط شده بود در دستگاه الکتروفورز ران شده و پس از ۴۵ دقیقه، به دستگاه UV Transilluminator منتقل و نتیجه مورد بررسی و عکسبرداری قرار میگرفت. باندهای بدست آمده با مقایسه با باندهای استرینهای مرجع و نیز مارکر وزنی مولکولی تفسیر می گردید.

استرینهای مرجعی که در این مطالعه از آنها استفاده گردید عبارت بود از:

- Leishmania infantum: (MCAN/IR/ 96/ Lon 49).
- L. major :(MHOM/IR/54/LV39).
-L. tropica:(MHOM/IR/89/ARD2).

تعدادی از نمونه ها نیز به منظور بررسی آلودگی لپتومونایی زیر استریومیکروسکپ تشریح و مجرای گوارشی آنها مورد بازبینی قرار میگرفت و در صورت مشاهده پروماستیگوت، از لام محتوی آنها استخراج DNA انجام می شد.

برای تعیین شاخص آنتروپوفیلیک، پشه خاکیهای ماده خون خورده را انتخاب و پس از جداسازی سر و قطعات انتهایی شکم برای تعیین هویت، خون معده آنها به آرامی بر روی کاغذهای واتمن شماره گذاری شده انتقال و برای تعیین منبع خون با استفاده از تست ELISA به آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال می گردید.

نتایج:

در این مطالعه مجموعاً ۱۲۶۸۸ عدد پشه خاکی از کل شهرستان صید گردید که از این تعداد ۵۶۴۸ عدد(۴۴/۵۲٪) ماده بودند. مجموعه ای متشکل از ۲۵ گونه پشه خاکی شامل ۱۴ گونه فلبوتوموس و ۱۱ گونه سرژانتومیا به عنوان فون پشه خاکیهای شهرستان ممسنی تعیین هویت گردید که از این میان گونه فلبوتوموس پاپاتاسی با ۳۰۸۴ عدد (۲۴/۳٪) گونه غالب و گونه ف. الکساندری با ۲۲۰۰ نمونه (۱۷/۳۴٪) سومین گونه غالب منطقه بود. در گونه اخیر ۱۵۵۲ نمونه (۷۰/۵٪) نر و ۶۴۸ نمونه (۲۹/۵٪) ماده بودند (جدول۱و۲).

به ترتیب تعداد ۱۲۰ ، ۵۰، ۵۰ و ۲۴ نمونه ماده از گونه های ف. الکساندری، ف. پاپاتاسی ، ف. سرژانتی و ف. ماژور تحت مطالعه استخراج DNA و PCR قرار گرفتند که آلودگی به لیشمانیا اینفانتوم در ۵ نمونه از گونه ف. الکساندری مشاهده گردید (۴/۱۷٪) (جدول ۱). باندهای حاصله از الکتروفورز محصولات PCR این پنج نمونه با باندهای استرینهای مرجع ل. اینفانتوم مشابه و معادل ۷۲۰bp بود (تصویر۱). باندهای مورد انتظار و مشاهده شده از نژاد های مرجع گونه های L. major,

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

L. L. tropica و L. infantum به ترتیب ۷۶۰، ۵۶۰ و ۷۲۰ جفت باز (Base Pair) بود. تعداد ۱۱۲، ۱۳۷ و ۵۹ نمونه از گونه های ف. پاپاتاسی، ف. الکساندری و ف. سرژانتی نیز به منظور بررسی آلودگی لپتومونایی تشریح گردیدند که ۲ مورد آلودگی در همین گونه ملاحظه و ثبت گردید (تصویر ۲). از این دو نمونه نیز استخراج DNA و PCR به عمل آمد و به عنوان L. infantum تعیین هویت گردیدند تعداد ۱۲۰ نمونه ماده خون خورده ف. الکساندری نیز پس از انتقال خون معده، مورد بررسی اندکس آنتروپوفیلیک با استفاده از تست ELISA قرار گرفتندکه ۳۹ مورد آنها (۳۲/۵٪) از انسان و ۲۹ مورد (۲۴/۲ ٪) از سگ خونخواری کرده بودند.

فعالیت فصلی پشه خاکیها در این منطقه از نیمه اول اردیبهشت ماه شروع و تا پایان آبانماه ادامه داشت و اوج فعالیت آنها نیز نیمه مردادماه می باشد.

بحث :

در مطالعه حاضر از میان نمونه های پشه خاکی ماده گونه فلبوتوموس الکساندری که مورد بررسی آلودگی به لیشمانیا با دو روش مشاهده مستقیم از طریق تشریح و مولکولی (PCR اختصاصی تعیین گونه لیشمانیا) قرار گرفتند دو مورد آلودگی لپتومونایی متعاقب تشریح و نیز پنج مورد آلودگی به لیشمانیا اینفانتوم با روش اختصاصی Semi Nested- PCR مشاهده و تأیید گردید . روش مورد استفاده در این مطالعه، تکنیک مولکولی Semi Nested-PCR بود که برای اولین بار در کشور برای مطالعه آلودگی لیشمانیایی پشه خاکیهای آلوده طبیعی در یک کانون اندمیک کالاآزار به کار گرفته شده است. باندهای بدست آمده از PCR این پنج نمونه با باندهای حاصل از نژاد مرجع ل. اینفانتوم دقیقاً مشابه بود. از میان نمونه های مورد بررسی این گونه برای تعیین نوع خون خورده شده از طریق تست ELISA ، ۳۲/۵ درصد آنها از انسان و ۲۴/۲ از مهمترین مخزن بیماری یعنی سگ خونخواری نموده بودند.

گونه ف. الکساندری قبلاً بعنوان ناقل قطعی L. donovani از چین (Li Ren G. et al. 1986) و ناقل لیشمانیوز پوستی از کشورهای ایران، عراق، الجزایر، جیبوتی، یونان، مراکش، تونس و یمن گزارش شده است (WHO 1990).

کنترل لیشمانیوز در مناطق اندمیک مستلزم شناخت دقیق اپیدمیولوژی بیماری و اکولوژی ناقلین و مخازن بیماری است. برای اپیدمیولوژیستها همواره شناسایی ناقلین و مخازن بیماری از مشکلات عمده بوده است. یافتن پشه خاکیهای آلوده طبیعی در تعیین گونه های ناقل قطعی و مطالعه نرخ آلودگی آنها بخصوص در نواحی اندمیک بسیار ضروری است (Aransay.A.M. et al. 2000).

کاربرد kDNA در تشخیص لیشمانیا در پشه خاکیهای آلوده قبلاً با استفاده از روشهای دیگری همچون هیبریداسیون DNA به اثبات رسیده است (Ready P.D. et al.1988; Rodriguez N.et al.1999) از تکنیک PCR نیز در مطالعات مختلفی برای تشخیص DNA لیشمانیا در گونه های پشه خاکی با موفقیت استفاده شده است (De Bruijn M.H. and Barker D.C. 1992 ; Mukherjee S. et al. 1997).

Aransay و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از پرایمرهای LIN R4 ، LIN 17 و LIN 19 که در مطالعه حاضر نیز از آنها استفاده شده است توانست آلودگی لیشمانیایی را در چهار گونه پشه خاکی از جمله گونه ف. الکساندری در یونان تشخیص دهد.

روش PCR قادر به تمایز میان آماستیگوت (مرحله ای از زندگی انگل در ماکروفاژهای مهره داران) و پروماستیگوت (شکل تاژکدار انگل در بدن پشه خاکی) نمی باشد (Aransay A.M. et al. 2000). به همین دلیل برای اطمینان از توانایی انتقال انگل توسط گونه پشه خاکی مورد بررسی، در این مطالعه از ماده های پاروس و خالی استفاده گردید که خون موجود در معده آنها کاملاً هضم شده بود. از آنجا که مشخص شده است که

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

آماستیگوتهای لیشمانیای موجود در خون خورده شده ظرف حدود ۲۴ ساعت و قبل از تکمیل هضم خون به فرم پروماستیگوت تبدیل می شوند (Molyneux D.H. and Ashford R.W. 1983).بنابراین بطور قطع میتوان نتیجه گیری کرد که DNA تشخیص داده شده در این مطالعه مربوط به فرم پروماستیگوت انگل بوده که قسمت بیشتری از سیکل زندگی خود را در بدن پشه خاکیهای مورد بررسی طی نموده است. ضمناً DNA انگل در نمونه های پاروس تشخیص داده شد که فرصت کافی برای طی سیکل زندگی انگل و انتقال بیماری را داشته اند.

نتیجه گیری :

با توجه به یافته های این مطالعه شامل مشاهده آلودگی به پروماستیگوت لیشمانیا در نمونه های تشریح شده، تشخیص DNA انگل ل. اینفانتوم در نمونه هایی از گونه ف. الکساندری با یک روش اختصاصی برای تعیین گونه انگل لیشمانیا با نرخ بالای آلودگی (۴/۱۷٪) که اکثر این نمونه ها از منازل بیماران جمع آوری گردیده بودند ، وفور بالای این گونه در منطقه (۱۷/۳۴ ٪ کل پشه خاکیهای صید شده) ، عدم صید قابل توجه گونه های زیرجنس لاروسیوس در این منطقه که قبلاً بعنوان ناقلین اصلی کالاآزار در ایران در نظر گرفته می شدند و همچنین اندکس آنترپوفیلیک بالای گونه فوق الذکر(۳۲/۵٪) و خونخواری قابل توجه آن از سگها که مخازن اصلی بیماری می باشند (۲۴/۲٪)، به نظر می رسد این گونه بعنوان ناقل قطعی کالاآزار در این کانون نوظهور ودومین ناقل قطعی در ایران باشد. لازم به ذکر است که این دومین گزارش از انتقال لیشمانیوز احشایی توسط این گونه در جهان و اولین گزارش جهانی از انتقال ل. اینفانتوم توسط این گونه می باشد.

تشکر و قدردانی:

مولفین مقاله لازم میدانند از زحمات آقایان مجید جلالی، محسن کلانتری و مهدی کرمیان که در مراحل نمونه برداری و آزمایشات مولکولی همکاری داشته اند صمیمانه تشکر نمایند.این مطالعه با حمایت مالی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران در قالب طرح مصوب شماره ۲۴۰/۷۳۱۶ مورخ ۸۲/۱۲/۱۹ انجام شده است.

جدول ۱- آمار صید، بررسی اندکس آنتروپوفیلیک و آلودگی لیشمانیایی (دو روش میکروسکپیک و مولکولی) چهار گونه اصلی از پشه خاکیهای صید شده در شهرستان ممسنی، استان فارس، ۸۴-۱۳۸۳.

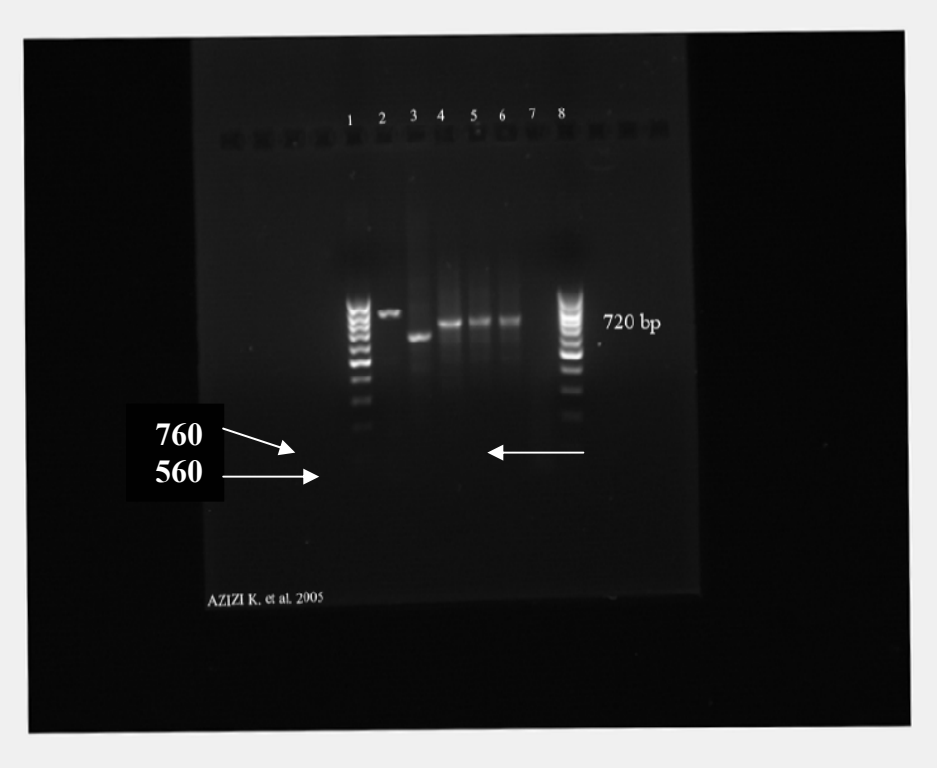
گونه	تعداد صید شده			بررسی نوع خون با روش الیزا		بررسی آلودگی لیشمانیایی با روش PCR		بررسی آلودگی لپتومونایی از طریق تشریح	
	ماده	نر	کل	تعداد مورد آزمایش	نمونه های خون انسانی تعداد (٪)	تعداد مورد آزمایش	تعداد و درصد آلودگی	تعداد مورد آزمایش	تعداد آلوده
فلبوتوموس پاپاتاسی	۹۴۰	۲۱۴۴	۳۰۸۴	۱۳۴	۵۰ (٪۳۷/۳)	۵۰	۰	۱۱۲	۲
فلبوتوموس الکساندری	۶۴۸	۱۵۵۲	۲۲۰۰	۱۲۰	۳۹ (٪۳۲/۵)	۱۲۰	۵ (٪ ۴/۲)	۱۳۷	۲
فلبوتوموس سرژنتی	۱۵۶	۵۷۶	۷۳۲	۱۰۶	۲۸ (٪۲۶/۴)	۵۰	۰	۵۹	۰
فلبوتوموس ماژور	۳۳	۱۲	۴۵	---	۵۰ (٪۳۷/۳)	۲۴	۰	---	---

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

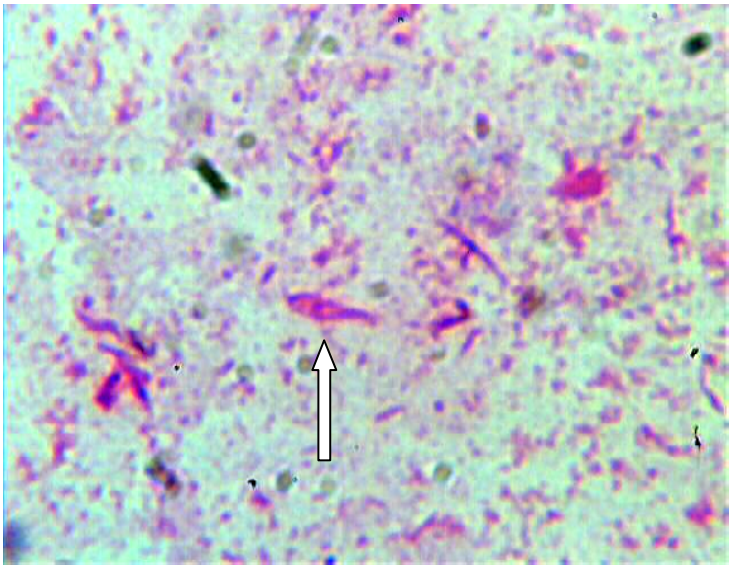
جدول ۲- آمار کلی صید طی مطالعات اکولوژیک پشه خاکیها (تعیین فون و فعالیت فصلی)، شهرستان ممسنی، ۱۳۸۳.

گونه	تعیین فون			در طول فعالیت فصلی			کل صید			درصد صید برای هر گونه			نسبت درصد گونه به کل
	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	
فلبوتوموس پاپاتاسی	۱۲۲۱	۴۶۶	۱۶۸۷	۹۲۳	۴۷۴	۱۳۹۷	۲۱۴۴	۹۴۰	۳۰۸۴	۶۹/۵	۳۰/۵	۱۰۰	۲۴/۳۰
فلبوتوموس الکساندری	۹۱۴	۳۱۴	۱۲۲۸	۶۳۸	۳۳۴	۹۷۲	۱۵۵۲	۶۴۸	۲۲۰۰	۷۰/۵	۲۹/۵	۱۰۰	۱۷/۳۴
فلبوتوموس سرژنتی	۳۵۰	۳۰	۳۸۰	۲۲۶	۱۲۶	۳۵۲	۵۷۶	۱۵۶	۷۳۲	۷۸/۷	۲۱/۳	۱۰۰	۵/۷۷
فلبوتوموس هالپنسسیس	۲۵۵	۰	۲۵۵	۱۸۹	۰	۱۸۹	۴۴۴	۰	۴۴۴	۱۰۰	۰	۱۰۰	۳/۵۰
فلبوتوموس برجروتی	۰	۵۱	۵۱	۰	۳۷	۳۷	۰	۸۸	۸۸	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۶۹
فلبوتوموس الانوره	۰	۳۶	۳۶	۰	۲۹	۲۹	۰	۶۵	۶۵	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۵۱
فلبوتوموس ماژور	۵	۲۵	۳۰	۷	۸	۱۵	۱۲	۳۳	۴۵	۲۶/۶	۷۳/۴	۱۰۰	۰/۳۵
فلبوتوموس کشیشیانی	۴	۰	۴	۴	۰	۴	۸	۰	۸	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۶
فلبوتوموس توبی	۶	۰	۶	۶	۰	۶	۱۲	۰	۱۲	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۹
فلبوتوموس مونگولنسیس	۶	۰	۶	۳	۰	۳	۹	۰	۹	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۷
فلبوتوموس انصاری	۶	۳	۹	۱	۵	۶	۷	۸	۱۵	۴۶/۷	۵۳/۳	۱۰۰	۰/۱۲
فلبوتوموس صالحی	۱۹	۱۲	۳۱	۱۶	۱۳	۲۹	۳۵	۲۵	۶۰	۵۸/۳	۴۱/۷	۱۰۰	۰/۴۷
فلبوتوموس کوکازیکوس	۳	۰	۳	۲	۰	۲	۵	۰	۵	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۴
فلبوتوموس لانجی داکتوس	۵	۰	۵	۲	۰	۲	۷	۰	۷	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۵
سرژنتومیا دنتاتا	۱۸۸	۱۲۲۰	۱۴۰۸	۶۵۷	۵۱۳	۱۱۷۰	۸۴۵	۱۷۳۳	۲۵۷۸	۳۲/۸	۶۷/۲	۱۰۰	۲۰/۳۲
سرژنتومیا سینتونی	۲۱۲	۲۶۳	۴۷۵	۲۱۷	۱۶۷	۳۸۴	۴۲۹	۴۳۰	۸۵۹	۴۹/۹	۵۰/۱	۱۰۰	۶/۷۷
سرژنتومیا تئودوری	۶۶	۴۲۸	۴۹۴	۲۳۴	۱۸۴	۴۱۸	۳۰۰	۶۱۲	۹۱۲	۳۲/۹	۶۷/۱	۱۰۰	۷/۱۹
سرژنتومیا بغدادیس	۲۷	۳۱۲	۳۳۹	۱۲۵	۱۴۲	۲۶۷	۱۵۲	۴۵۴	۶۰۶	۲۵/۱	۷۴/۹	۱۰۰	۴/۷۷
سرژنتومیا تیبریادیس	۶۵	۱۱۹	۱۸۴	۶۵	۶۶	۱۳۱	۱۳۰	۱۸۵	۳۱۵	۴۱/۳	۵۸/۷	۱۰۰	۲/۴۸
سرژنتومیا پالستینسیس	۱۳	۱۶	۲۹	۶	۱۷	۲۳	۱۹	۳۳	۵۲	۳۶/۵	۶۳/۵	۱۰۰	۰/۴۱
سرژنتومیا پائولوسکی	۱۸۷	۰	۱۸۷	۹۲	۰	۹۲	۲۷۹	۰	۲۷۹	۱۰۰	۰	۱۰۰	۲/۲۰
سرژنتومیا کلایدی	۲۵	۱۳۲	۱۵۷	۳۸	۷۷	۱۱۵	۶۳	۲۰۹	۲۷۲	۲۳/۲	۷۶/۸	۱۰۰	۲/۱۴
سرژنتومیا آفریکانا	۰	۲	۲	۰	۴	۴	۰	۶	۶	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۰۵
سرژنتومیااسکوامی پلوریس	۰	۸	۸	۰	۱۵	۱۵	۰	۲۳	۲۳	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۱۸
سرژنتومیا آنتناتا	۵	۰	۵	۷	۰	۷	۱۲	۰	۱۲	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۹

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021



تصویر۱- نتایج الکتروفورز محصولات **PCR** استخراج شده از پشه خاکیها و استرینهای مرجع در ژل آگاروز ۱/۵٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. به ترتیب خطوط: ۱و۸- مارکر مولکولی، ۲- استرین مرجع **L. tropica**. ۳- استرین مرجع **L. major**. ۴- استرین مرجع **L. infantum**. ۵ و۶- نمونه های مربوط به پشه خاکی **P. alexandri** . ۷- کنترل منفی (پشه خاکی نر).



تصویر ۲- پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم جدا شده از یک نمونه فلبوتوموس الکساندری تشریح شده، شهرستان ممسنی، استان فارس، ۱۳۸۳.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

منابع:

اردهالی، صدرالدین. رضایی، حمیدرضا و ندیم، ابوالحسن.(۱۳۷۳) انگل لیشمانیا و لیشمانیوز. چاپ دوم. تهران: مرکز نشر دانشگاهی.

پویا، یحیی. (۱۳۲۸) کالاآزار در ایران، مجله دانشکده پزشکی تهران (۲۷): ۲۸-۲۵.

فخار، مهدی.، محبعلی، مهدی و بارانی، محمد (۱۳۸۳). معرفی یک کانون آندمیک کالاآزار در استان قم و بررسی سرواپیدمیولوژی عفونت لیشمانیایی احشایی در انسان و مخازن حیوانی (سگ) این منطقه. مجله ارمغان دانش (۳۳): ۵۲-۴۳.

Alexander B. (2000) Sampling method of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinari Entomology.* **14**: 109-122.

Aransay A.M., Scoulica E. and Tselentis Y.(2000) Detection and identification of leishmania. DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA.*Applied Environmental Microbiology.***66**:1933-38

De Bruijn M.H. and Barker D.C. (1992) Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica.* **52**: 45-58.

Edrissian G.H., Ahanchin H. and Gharachahi A.R. (1993) Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in fars province, southern Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences.* **18:** 99-105.

Edrissian G.H., Nadim A., Alborzi A.V. and Ardehali S. (1999) Visceral leishmaniasis: the Iranian experiences. *Archives of Iranian Medicine.* **1**: 22-26.

Lewis D.J. (1982) A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of British Museum Natural History* (Entomol). **45**: 121-209.

Li-Ren G., Yong-Xiang X., Bao-Shan L. and Jiang D. (1986) The role of *Phlebotomus alexandri* ,sinton 1928, in the transmission of Kala-azar. *Bulletin of WHO*. **64:** 107-112.

Mohebali M., Hamzavi Y., Edrissian G.H. and Frouzani G.H. (2001) Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in bushehr province, south of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal.* **7:** 912-17.

Mohebali M., Poormohammadi B., Kanani A., Hajjaran H. and Edrissian G.H. (1998) Rodents: another group of animal hosts of visceral leishmaniasis in Meshkin-shahr district, Islamic Republic of Iran. *Iranian Journal of Public Health*. **4**(2): 376-78.

Mohebali M., Hajjaran H., Hamzavi Y., Mobedi I., Arshi S., Zarei Z., Akhoundi B., Manouchehri K., Avizeh R. and Fakhar M. (2005) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic republic of Iran. *Veterinari Parasitology.* **129**: 242-51.

Molyneux D.H. and Ashford R.W. (1983) The biology of trypanosome and leishmania parasites of human and domestic animals. London, Taylor & Francis.

Motazedian M.H., Karamian M., Noyes H.A. and Ardehali S. (2002) DNA extraction and amplification of leishmania from archieved, Giemsa stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **96**: 31-34.

Mukherjee S., Hassan M.Q. and Ghosh A. (1997) Short report: leishmania DNA in Phlebotomus and Sergentomyia species during a kala-azar epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **57:** 423-425.

Peters W. and Killick-Kendrick R. (1987) Leishmania in biology and medicine. Academic Press, New York . 550.

Rassi Y., Javadian E., Nadim A., Zahraii A., Vatandoost H., Motazedian H., Azizi

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 10:28 IRDT on Tuesday May 11th 2021

of Royal Society Tropical Medicine Hygiene . **93**: 47-49.

Sahabi Z., Seyedi-Rashti M.A., Nadim A., Javadian E., Kazemeini M. and Abai M.R. (1992) A preliminary report on the natural leptomonad infection of *Phlebotomus major* in an endemic focus of VL in fars province, south of Iran. *Iranian Journal of Public Health.* **21:** 87-93.

Seyedi-Rashti M.A., Sahabi Z. and Kanani Notash A. (1995) *Phlebotomus (Larroussius) keshishiani* , Shchurenkova 1936, another vector of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian Journal of Public Health*. **24**: 23-30.

World Health Organization (1990) Control of Leishmaniases, Report of a WHO expert committee. Technical Report No. 793, Geneva. 159.

World Health Organization (2000) Leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infection, WHO/CDC/CSR/ISR. 1-2.

K. and Mohebali M. (2005) Phlebotomus (Larrossius) kandelakii,the principal and proven vector of visceral leishmaniasis in north-west of Iran.*Pakistan Journal of Biological Sciences.,* **8**(12): 1802-1806.

Rassi Y., Javadian E. and Nadim A. (1997) Natural promastigote infection of sand flies and its first occurrence in *Sergentomyia dentate* in ardabil province, north west of Iran.*Iranian Journal of Public Health.* **26:** 7-12.

Ready P.D., Smith D.F. and Killick-Kendrick R. (1988) DNA hybridization on squash-blotted sand flies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major. Medical and Veterinary Entomology*. **2**: 109-116.

Rodriguez N., Aguilar C.M., Barrios M.A. and Barker D.C.(1999) Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Transaction*