

فلبوتوموس (پارافلوتوموس) 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 راغی: دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران - نویسنده رابط: rassy@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 پیآمدهای 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 مهورمیلاتی، شهرستان ممسنی واقع در استان با استفاده از دو روش میکروسکوپیک 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 آسپراتور 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-PCR با 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 (پارافلوتوموس) 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 و به نظر میرسد گونه ف. الکساندری بعنوان ناقل بیماری در این کانون و دومین ناقل قطعی (Proven Vector) کالاآزار در ایران باشد.

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

مقدمه :

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 ۱-۲ 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 خاکپها در مناطق اندمیک بیماری، سه گونه فلپوتوموس 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 غربی 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 جواندگان نیز جدا شده است (Mohebali M. et al. 1998).

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

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 دونووانی 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 و میر سالیانه آن ۷۵۰۰۰ نفر است که عمدتاً در هند، سودان و برزیل اتفاق می افتد (WHO 2000).

عامل بیماری تک یاخته ای از تازکداران خونی و نسجی از جنس *Leishmania* است که انواعی از آن برای انسان بیماریزاست. ناقلین بیماری پشه خاکپهای فلپوتومینه از خانواده پسیکودیده هستند که از حدود ۷۰۰ گونه شناخته شده آنها، شواهد برای قطعی بودن ناقلیت ۱۹ گونه کافی است (۱۱ گونه فلپوتوموس 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 خاکپها که پس از هضم خون هم دیده شود بیشتر حائز اهمیت است تا آلودگی در حضور خون خورده شده باشد (Alexander B. 2000).

2002) با مختصری تغییرات انجام می شد. بطور خلاصه بدن هر پشه خاکی در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری بوسیله پیست پاستور استریل کاملاً له میشد. سپس به این فرآورده ۲۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده 50 mM Tris-HCl (Ph,7.6) ; 1mM EDTA ; Proteinase K (1% Tween20) و ۱۲ میکرولیتر اضافه نموده و مخلوط حاصل یک شب در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده می شد. پس از اضافه نمودن ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل/کلروفرم/ایزواکامیل (۱:۲۴:۲۵ V/V/V) در دور 10000rpm (دور در دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ به عمل می آمد و محلول رویی حاوی DNA به کمک سمپلر به تیوب دیگری انتقال داده میشد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر اتانول خالص اضافه و مجدداً سانتریفیوژ می شد که باعث رسوب DNA میگردد. سپس DNA در انکوباتور خشک شده و نهایتاً با اضافه نمودن مقدار مناسب DDW تا زمان انجام PCR در یخچال نگهداری می گردید. تکثیر (Amplification) ناحیه متغیر (Variable area) مینی سیرکلهای کیتوپلاست 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:

- MgCl₂: 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.

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 خاکپها با استفاده از تله های چسبان (Sticky traps)، تله های نوری مینیاتوری CDC و اسپیراتور 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 خاکپها به روش ریخت شناسی (Morphology) و با استفاده از کلید پشه خاکپهای ایران انجام گرفت (Lewis D.J. 1982).

استخراج DNA به روش توصیه شده توسط معتمدیان و همکاران (Motazedian M.H. et al.)

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

برای تعیین شاخص آنتروپوفیلیک، پشه خاکیهایی 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 سرزانتومیا به عنوان فون پشه خاکیهایی 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 (جدول ۱ و ۲).

به ترتیب تعداد ۱۲۰، ۵۰، ۵۰ و ۲۴ نمونه ماده از گونه های ف. الکساندری، ف. پاپاتاسی، ف. سرزانتی 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 ۷۲۰ bp بود (تصویر ۱). باندهای مورد انتظار و مشاهده شده از نژاد های مرجع گونه های *L. major*,

تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (Corbett Research, CGI-96, Australia) انجام شد. ابتدا دناتوره شدن اولیه (Initial Denaturation) ۵ دقیقه طی حرارت ۹۴ 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. مقدار 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).

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 خاکیه‌های آلوده طبیعی در تعیین گونه‌های 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 خاکیه‌های 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 گونه‌های 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 تازکدار 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 ماده‌های پارسوس و خالی استفاده گردید که خون موجود در معده آنها کاملاً هضم شده بود. از آنجا که مشخص شده است که

L. L. tropica و L. infantum به ترتیب ۷۶۰، ۵۶۰ و ۷۲۰ جفت باز (Base Pair) بود. تعداد ۱۱۲، ۱۳۷ و ۵۹ نمونه از گونه‌های 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 هويت 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 گرفتند که ۳۹ مورد آنها (۳۲/۵٪) از انسان و ۲۹ مورد (۲۴/۲٪) از سگ خونخواری کرده بودند.

فعالیت فصلی پشه خاکیه‌ها 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 نمونه‌های پشه خاکی ماده گونه فلپوتوموس 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 خاکیه‌های 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 نمونه‌های 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.

زیرجنس لاروسیوس در این منطقه که قبلاً بعنوان ناقلین اصلی کالاآزار در ایران در نظر گرفته می شدند و همچنین اندکس آنتروپوفیلیک 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 و دومین ناقل قطعی در ایران باشد. لازم به ذکر است که این دومین گزارش از انتقال لیثمانیوز 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 کرمان 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.

آماستیگوتهای لیثمانیای 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:

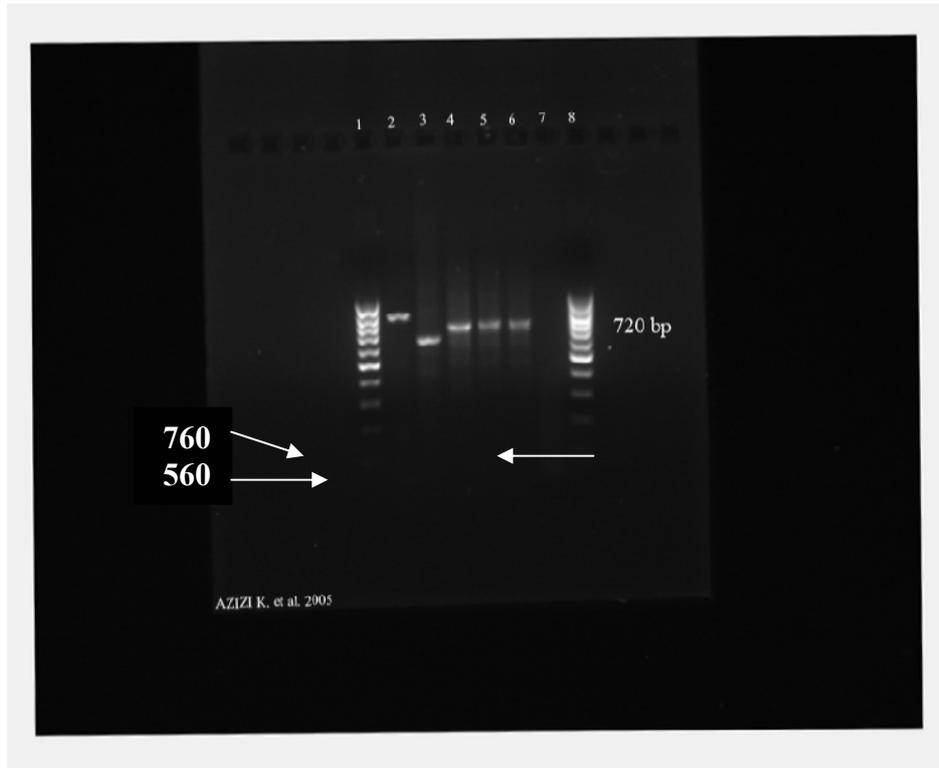
با توجه به یافته های این مطالعه شامل مشاهده آلودگی به پروماستیگوت لیثمانیا در نمونه های تشریح شده، تشخیص DNA انگل ل. اینفانتوم در نمونه هایی از گونه ف. الکساندری با یک روش اختصاصی برای تعیین گونه انگل لیثمانیا با نرخ بالای آلودگی (۴/۱۷٪) که اکثر این نمونه ها از منازل بیماران جمع آوری گردیده بودند، و فور بالای این گونه در منطقه (۱۷/۳۴٪ کل پشه خاکیهای صید شده)، عدم صید قابل توجه گونه های

جدول ۱- آمار صید، بررسی اندکس آنتروپوفیلیک و آلودگی لیثمانیایی (دو روش میکروسکوپی 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 لیثمانیایی با روش PCR		بررسی آلودگی لپتومونایی از طریق تشریح	
	ماده	کل	تعداد مورد	نمونه های خون انسانی (%)	تعداد مورد	تعداد و درصد آلودگی	تعداد مورد	تعداد آلوده
فلبوتوموس پاپاتاسی	۹۴۰	۲۱۴۴	۱۳۴	۵۰ (۳۷/۳٪)	۵۰	۰	۱۱۲	۲
فلبوتوموس الکساندری	۶۴۸	۱۵۵۲	۱۲۰	۳۹ (۳۲/۵٪)	۱۲۰	۵ (۴/۲٪)	۱۳۷	۲
فلبوتوموس سرژنتی	۱۵۶	۵۷۶	۱۰۶	۲۸ (۲۶/۴٪)	۵۰	۰	۵۹	۰
فلبوتوموس ماژور	۳۳	۱۲	---	۵۰ (۳۷/۳٪)	۲۴	۰	---	---

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 بروجروتی	۰	۵۱	۵۱	۰	۳۷	۳۷	۰	۸۸	۸۸	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۶۹
فلبوتوموس الاثوره	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 مونگولنسسیس	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 کوزیکوس	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 دناتا	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 تتودوری	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 تیبیریادیس	۶۵	۱۱۹	۱۸۴	۶۵	۶۶	۱۳۱	۱۳۰	۱۸۵	۳۱۵	۴۱/۳	۵۸/۷	۱۰۰	۲/۴۸
سرژنتومیا پالستینسسیس	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
سرژنتومیا اسکوامی پلوریس	۰	۸	۸	۰	۱۵	۱۵	۰	۲۳	۲۳	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۱۸
سرژنتومیا آنتاتا	۵	۰	۵	۷	۰	۷	۱۲	۰	۱۲	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰/۰۹



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR استخراج شده از پشه خاکپها و استرینهای مرجع در ژل آگاروز ۱/۵٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. به ترتیب خطوط: ۱ و ۸- مارکر مولکولی، ۲- استرین مرجع *L. tropica*، ۳- استرین مرجع *L. major*، ۴- استرین مرجع *L. infantum*، ۵ و ۶- 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.

منابع:

- Phlebotomus alexandri*, sinton 1928, in the transmission of Kala-azar. *Bulletin of WHO*. **64**: 107-112.
- Mohebalı 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.
- Mohebalı 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.
- Mohebalı 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 archived, 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 Ardehali, صدرالدین. رضایی، حمیدرضا و ندیم، ابوالحسن. (۱۳۷۳) انگل لیشمانیا و لیشمانیوز. چاپ دوم. تهران: مرکز نشر دانشگاهی.
- پویا، یحیی. (۱۳۲۸) کالآزار در ایران، مجله دانشکده پزشکی تهران (۲۷): ۲۵-۲۸.
- فخار، مهدی، محبعلی، مهدی و بارانی، محمد (۱۳۸۳). معرفی یک کانون آندمیک کالآزار در استان قم و بررسی سرواپیدمیولوژی عفونت لیشمانیایی احشایی در انسان و مخازن حیوانی (سگ) این منطقه. مجله ارمغان دانش (۳۳): ۴۳-۵۲.
- 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

- 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 Leishmaniasis, 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 Mohebbali M. (2005) *Phlebotomus (Larroussius) 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 ardebil 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*