مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران؛ ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۳: صفحات ۳۳-۲۷.

مقاله پژوهشی

# شناسایی ناقلین بیماری لیشمانیوز جلدی در کانون شهرستان جاسک، استان هرمزگان با استفاده از تکنیک Nested-PCR

**کوروش عزیزی[۱]، محسن کلانتری[۲]، سجاد فکری[۳]**

[۱]دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکزتحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، ایران

[۲]کارشناس ارشد گروه قارچ و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

[۳]کارشناس مبارزه با بیماری‌ها، مرکز بهداشت استان هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، ایران

نویسنده مسئول: کوروش عزیزی، نشانی: شیراز، کوی زهرا، دانشکده بهداشت و تغذیه، گروه حشره شناسی پزشکی، تلفن: ۴-۷۲۵۱۰۰۱-۰۷۱۱، پست الکترونیک: azizik@sums.ac.ir

تاریخ دریافت:۸۹/۹/۲۹ پذیرش:۹۰/۲/۳

**مقدمه و اهداف:** تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR با حساسیت و اختصاصیت بالا قادرند تعداد کم انگل در بدن ناقلین را نیز تشخیص دهند. شهرستان جاسک در جنوب شرقی کشور مهم‌ترین کانون بیماری سالک در استان هرمزگان بوده است. مطالعه حاضر بمنظور تعیین ناقلین بیماری در این کانون اجرا گردید.

**روش کار:** در مطالعه ای توصیفی مقطعی در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ پشه خاکی‌ها صید و با استفاده از کلیدهای تشخیصی مورد شناسایی قرار گرفتند. استخراج DNA بروش پروتئیناز K و فنل/کلروفرم/آیزوآمیل الکل انجام و تکثیر بخش متغیر مینی سیرکل‌های کینتوپلاست انگل نیز با استفاده از دو تکنیک Nested-PCR و با سری پرایمرهای LIN R4-LIN17-LIN19 و CSB2XF-CSB1XR-LiR-13Z صورت پذیرفته و باندهای حاصله با مقایسه با نمونه‌های استاندارد شناسایی شدند.

**نتایج:** در مجموع ۸۱۲۳ عدد پشه خاکی از هشت گونه (سه گونه فلبوتوموس و پنج گونه سرژانتومیا) صید و تعیین هویت گردید. سه گونه فلبوتوموس پاپاتاسی؛ فلبوتوموس صالحی و سرژانتومیا تئودوری به ترتیب با ۵۹/۹۱؛ ۱۷/۲۱ و ۷/۳۲ درصد صید گونه‌های غالب بودند. آلودگی لیشمانیایی در سه نمونه (۵٪) از گونه ف. پاپاتاسی و دو نمونه (۴٪) از گونه ف. صالحی مشاهده و گونه انگل Leishmania major تعیین گردید. ترجیح خونخواری این دو گونه از انسان بترتیب ۲۹/۶ و ۱۸ درصد بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر اولین مطالعه تعیین ناقلین بیماری لیشمانیوز پوستی به روش مولکولی در استان هرمزگان بود که نشان داد نوع بیماری در این کانون نوظهور از نوع روستایی یا مرطوب و با عامل لیشمانیا ماژور است. براین اساس دو گونه پشه خاکی ف. پاپاتاسی و ف. صالحی به عنوان ناقلین بیماری در این کانون معرفی می‌شوند.

**واژگان کلیدی:** لیشمانیوز پوستی، لیشمانیا ماژور، فلبوتوموس پاپاتاسی، فلبوتوموس صالحی، جاسک و ایران

## مقدمه

علیرغم سال‌ها تلاش پیگیر مسؤولین بهداشتی کشور جهت پیشگیری و کنترل بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک)، متأسفانه این بیماری همواره در حال گسترش بوده و هر ساله کانون‌های جدیدی از بیماری در مناطقی که قبلاً بیماری در آن‌ها وجود نداشته گزارش می‌گردد بطوری که در حال حاضر در ۱۷ استان کشور این بیماری بصورت اندمیک وجود دارد (۱).

ناقلین لیشمانیوزها پشه خاکی‌های زیر خانواده فلبوتومینه (Diptera: Psychodidae) هستند و از بیش از ۷۰۰ گونه شناخته شده از این زیرخانواده حدود ده درصد آن‌ها در انتقال پاتوژن‌های مختلف و از جمله انگل تک یاخته و تاژکدار لیشمانیا (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) نقش دارند (۲). تا کنون ۲۱ گونه از این انگل به عنوان پاتوژن انسانی شناخته شده‌اند (۳). در منطقه خاورمیانه، غرب آسیا و جنوب صحرای آفریقا تمام ناقلین قطعی عامل فرم مرطوب یا روستایی لیشمانیوز پوستی (ZCL)، یعنی Leishmania major (بجز بعضی از گونه‌های ناقل مشکوک) از زیرجنس Phlebotomus و اغلب ناقلین قطعی Le. tropica (عامل لیشمانیوز جلدی خشک یا شهری) و Le. infantum (عامل لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار) از زیر جنس‌های Paraphlebotomus و Larroussius هستند (۴). ناقل قطعی و اصلی لیشمانیوز جلدی مرطوب (ZCL) در کشورهایی

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

همچون ترکمنستان، ازبکستان، عربستان سعودی، ایران، مراکش و تونس فلبوتوموس پاپاتاسی است (۴،۵).

در کلیه مطالعات انجام شده بر روی ناقلین بیماری سالک مرطوب در ایران پشه خاکی Phlebotomus papatasi به عنوان ناقل قطعی (Proven Vector) و اصلی (Primary Vector) گزارش شده است (۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱). بجز این گونه پشه خاکی‌های دیگری نیز به عنوان ناقل انگل در بین جوندگان در مناطق روستایی کشور گزارش شده‌اند از جمله P.(Para) andrejevi ،(Paraphlebotomus) alexandri P.(Para) caucasicus, ،P.(Para) moghulensis و P. (Synphlebotomus) ansarii (۶،۷،۱۲،۱۳).

پشه خاکی P. (Phlebotomus) salehi نیز در چند نوبت بعنوان ناقل احتمالی لیشمانیا ماژور گزارش شده است. اولین گزارش از منطقه چابهار استان سیستان و بلوچستان بود که بدون آنکه گونه انگل مشخص شود آلودگی این گونه به لپتوموناد مشاهده گردید (۱۴). اخیراً نیز نگارنده و همکاران (۱۳۸۷) در کانون شهرستان قیروکارزین در استان فارس و نیز قوامی و همکاران (۱۳۸۹) در کانون شهرستان جهرم همین استان با روش مولکولی آلودگی طبیعی این گونه به Le. major را مشاهده نموده‌اند (اطلاعات منتشر نشده، در حال چاپ).

هر چند روش Zymotaxonomy و بررسی ایزوآنزیم‌ها روش قاطع و Gold Standard برای شناسایی گونه‌ها و سویه‌های مختلف انگل لیشمانیاست (۱۵) و یعقوبی ارشادی و همکاران نیز از همین روش استفاده و Le. major (Zymodeme MON 26) را از دو گونه P. papatasi وP. caucasicus از منطقه برخوار اصفهان گزارش نموده اند (۱۲،۱۳)، ولی این روش مشکلات خاص خود همچون هزینه بر و مشکل بودن در اجرا، نیاز به انگل زنده و کشت انبوه انگل و نیز در آلودگی‌های مکرر (Mixed) معمولاً فقط استرینی را تشخیص میدهد که قادر به تطابق با شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت بوده و سریعاً رشد نماید (۹).

روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR سال‌هاست که با سهولت و بطور روتین در آزمایشگاه‌های معتبر دنیا و نیز بوسیله محققین داخلی برای شناسایی انگل در بدن ناقلین و مخازن بیماری لیشمانیوز با موفقیت استفاده می‌شوند (۹،۱۱،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰). این روش‌ها با حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به تشخیص تعداد کم انگل بوده و از منابع مختلف DNA مثل هسته، کینتوپلاست، ریبوزوم و غیره استفاده می‌نمایند (۱۷،۲۱).

شهرستان جاسک در جنوب شرقی کشور (۲۵°۲۴′ - ۲۶°۵۸′ عرض شمالی و ۵۷°۱۱′ - ۵۹°۱۵′ طول شرقی از نصف النهار گرینویچ) در همسایگی استان سیستان و بلوچستان در حال حاضر آلوده‌ترین شهرستان استان هرمزگان است بطوری که در سال‌های ۱۳۸۶ و ۸۷ با ۲۴۵ و ۱۹۵ مورد بیماری سالک به ترتیب ۵۲/۷ و ۴۲/۷ درصد کل موارد بیماری استان را بخود اختصاص داده است. از آنجا که تا کنون هیچگونه مطالعه‌ای بر روی ناقلین بیماری در این منطقه از کشور انجام نشده بود، مطالعه حاضر به منظور تشخیص آلودگی طبیعی پشه خاکی‌های این کانون نوظهور به انگل لیشمانیا و تعیین ناقلین بیماری با استفاده از روش‌های مولکولی انجام گردید.

## روش کار

در این مطالعه توصیفی (Descriptive) که به روش مقطعی (Cross-Sectional) در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ انجام شد، پشه خاکی‌ها با استفاده از تله‌های چسبان (Sticky Papers) و تله‌های نوری مینیاتوری CDC از مناطق مختلف شهرستان و بخصوص از اماکن داخلی و خارجی روستاهای با آمار بالای آلودگی صید گردید. از آنجا که در تکنیک‌های مبتنی بر PCR نیازی به نمونه زنده و تازه نیست، پشه خاکی‌ها تا زمان آماده سازی برای استخراج DNA و PCR در اتانول ۷۰٪ نگهداری شدند (۲۲). در آزمایشگاه ابتدا نمونه‌ها بمدت ۵ دقیقه در دترجنت ۱٪ قرار داده شده و پس از پاکسازی و خشک شدن، بر روی لامی حاوی یک قطره محلول PBS سر و چند بند انتهایی شکم (حاوی اسپرماتکا) جدا و برای تعیین هویت پشه خاکی (۲۳) بر روی لام دیگری در یک قطره محیط پوری (۲۴) مونته شده و از بقیه بدن شامل سینه و بخش اصلی شکم (حاوی میدگات) برای استخراج DNA استفاده گردید. خون موجود در معده تعدادی از نمونه های ماده گونه‌های مشکوک به انتقال بیماری بر روی کاغذهای واتمن شماره گذاری شده منتقل و برای تعیین نوع خون با استفاده از روش سرولوژیک ELISA به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده بهداشت تهران ارسال گردید.

استخراج DNA به روش عزیزی و همکاران انجام شد. بطور خلاصه به این ترتیب که پس از همژنایز نمودن بدن پشه خاکی‌ها در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی لیتری، µl200 Lysis Buffer و µl 12 پروتئیناز K اضافه شده و سپس با اضافه نمودن µl300 محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل فرآیند استخراج DNA ادامه می‌یافت. DNA استخراج شده در میزان مناسب بافر TE تا زمان PCR در یخچال C4° نگهداری می‌گردید (۱۱،۱۹،۲۰).

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

برای تکثیر ناحیه متغیر (Variable) مینی سیرکل‌های DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا (minicircle kDNA) از تکنیک Nested-PCR و دو سری پرایمر استفاده گردید. در یکسری از آزمایشات از پرایمرهای LINR4 بعنوان فوروارد در هر دو مرحله، پرایمر LIN17 به عنوان Reverse مرحله اول و پرایمر LIN19 به عنوان پرایمر Reverse مرحله دوم استفاده گردید. توالی پرایمرها بصورت زیر بود.

- LIN R4: 5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3'.
- LIN 17: 5'- TTT GAA CGG GAT TTC TG-3'.
- LIN 19: 5'- CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'.

این تکنیک توسط Aransay و همکاران در سال ۲۰۰۰ طراحی شده و بوسیله نگارنده و همکاران در مطالعات متعددی برای تشخیص انگل لیشمانیا در بدن ناقلین و مخازن لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته بود (۱۱،۱۷،۲۰). حجم مواد مورد نیاز (در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر) و پروفایل حرارتی دو مرحله بصورت زیر بود.

250 µM of each dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 1U Taq Polymerase (Cinagene, Tehran), 1 µM primer LINR4, 1 µM primer LIN 17, 5 µl of DNA extract in 1X PCR buffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

این حجم مواد در هر دو مرحله یکسان بود فقط پرایمر Reverse در مرحله دوم تعویض شده و دو مایکرولیتر از محصول مرحله اول به عنوان Template DNA برای واکنش مرحله دوم استفاده می شد. در مرحله اول پس از یک حرارت اولیه ۹۴°C بمدت ۵ دقیقه (Initial Denaturation)، تکثیر ادامه می یافت با ۳۰ ثانیه در (Denaturation 94C°، 30 ) ثانیه در (Annealing۵۲ C°) و ۱ دقیقه در (Extension۷۲C°) و نهایتاً ۱۰ دقیقه حرارت (Final Extension)۷۲ C° (مرحله اول در ۳۰ سیکل تکرار می‌شد). پروفایل حرارتی مرحله دوم نیز شبیه مرحله اول بود البته بدون حرارت اولیه و نیز درجه حرارت مرحله Annealing آن ۵۸°C بود. مرحله دوم ۳۳ سیکل تکرار می‌شد.

در تکنیک دوم که بوسیله Noyes و همکاران در سال ۱۹۹۸ و سپس مؤمن بالله فرد و همکاران ۲۰۰۳ برای تشخیص انگل از بدن جوندگان استفاده شده بود از دو سری پرایمر برای دو مرحله (Nested) استفاده گردید. پرایمرهای CSB1XF و CSB2XR برای مرحله اول و پرایمرهای LiR و Z۱۳ برای مرحله دوم. توالی این پرایمرها بصورت زیر بود (۱۶،۱۸):

CSB1XR: 5'-CGA GTA GCA GAA ACT CCC GTT CA-3'
CSB2XF: 5'-ATT TTT CGC GAT TTT CGC AGA ACG-3'
LiR: 5'-TCG CAG AAC GCC CCT-3'
13Z: 5'-ACT GGG GGT TGG TGT AAA ATA-3'

مخلوط واکنش مرحله اول در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر و شامل مواد زیر بود:

(250 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 1.0 U. Taq DNA polymerase, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1% Tween 20, 40 ng each of CSB1XF & CSB2XR Primers).

مخلوط واکنشی مرحله دوم نیز دقیقاً مثل مرحله اول بود فقط پرایمرهای آن بوسیله پرایمرهای LiR و Z۱۳ و با همان ترکیب جایگزین گردید. واکنش‌ها با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Progene کارخانه Techne Cambridge UK انجام شد. پروفایل حرارتی هر دو مرحله به این صورت بود که پس از یک حرارت اولیه ۹۴°C بمدت ۵ دقیقه (Initial Denaturation) ، تکثیر ادامه می‌یافت با ۱ دقیقه در (Denaturation 94C°)، 1 دقیقه در (Annealing ۵۴ C°) و ۱ دقیقه در (Extension ۷۲ C°) و نهایتاً ۱۰ دقیقه حرارت (Final Extension۷۲C°) (هر دو مرحل در ۲۵ سیکل تکرار می‌شد). محصول مرحله اول به نسبت ۱:۹ با آب دیونیزه رقیق و به عنوان Template DNA برای مرحله دوم استفاده می‌شد.

پس از تکثیر DNA مورد نظر، میزان ۵ مایکرولیتر از محصول تکنیک اول و ۳ مایکرولیتر از محصول تکنیک دوم پس از اختلاط با Loading Buffer بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید به مدت حدود ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و پس از آشکارسازی در دستگاه UV Transilluminator با مقایسه باندهای حاصله از نمونه‌های مورد بررسی با باندهای حاصل از استرین‌های استاندارد مورد شناسایی قرار می‌گرفتند. از استرین‌های استاندارد Le. tropica: ،Le. infantum: MCAN/IR/96/Lon49 Le. major: MHOM/IR/54/LV39 و MHOM/IR/89/ARD2 جهت مقایسه استفاده گردید. این استرین‌ها از گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی شیراز گرفته شده بود. برای کلیه واکنش‌ها بمنظور اطمینان از صحت عملکرد از کنترل منفی که DNA نمونه جنس نر از گونه مورد بررسی بود استفاده می‌گردید.

## نتایج

در این مطالعه در مجموع ۸۱۲۳ عدد پشه خاکی صید گردید که ۴۶۷۲ نمونه (۵۷/۵۲٪) نر و ۳۴۵۱ نمونه (۴۲/۴۹ ٪) ماده بودند. از این تعداد ۳۱۷۴ نمونه (۳۹/۰۷ ٪) از اماکن داخلی و ۴۹۴۹ نمونه (۶۰/۹۳ ٪) از اماکن خارجی صید گردیده بودند. در مجموع هشت گونه پشه خاکی شناسایی گردید (سه گونه از جنس فلبوتوموس و پنج گونه از جنس سرژانتومیا). گونه‌های فلبوتوموس پاپاتاسی با ۴۸۶۷ نمونه (۵۹/۹۱٪)، فلبوتوموس صالحی با ۱۳۹۸

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

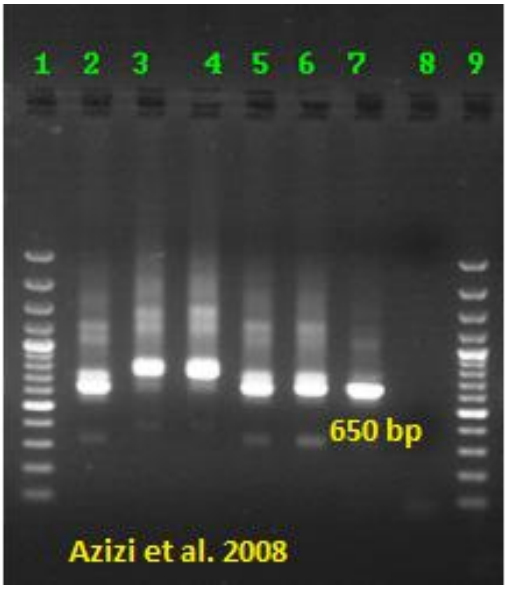
نمونه (۱۷/۲۱٪) و سرژانتومیا تیبریادیس با ۵۹۵ نمونه (۷/۳۲ ٪) به ترتیب گونه‌های غالب بودند. سایر گونه‌های تشخیص داده شده عبارت بودند از فلبوتوموس ماژور (۱/۳۹٪)، سرژانتومیا سینتونی (۵/۳۷٪)، سرژانتومیا تئودوری (۵/۷۷٪)، سرژانتومیا دنتاتا (۱/۳۸٪) و سرژانتومیا کلایدئی با ۱/۶۴ درصد صید از کل نمونه‌های صید شده.

تعداد ۵۴ و ۵۰ نمونه ماده خونخورده از دو گونه ف. پاپاتاسی و ف. صالحی به منظور تعیین نوع خون خورده شده مورد بررسی با استفاده از آزمون سرولوژیک ELISA قرار گرفتند (آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده بهداشت تهران) که به ترتیب ۲۹/۶ و ۱۸ درصد آن‌ها از انسان خون خورده بودند (Anthropophilic Index).

به ترتیب تعداد ۶۰، ۵۰ و ۴۰ نمونه ماده پاروس و خالی از خون از سه گونه ف. پاپاتاسی، ف. صالحی و س. تئودوری انتخاب و در پروسه استخراج DNA و PCR قرار گرفتند که نتایج این بررسی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. گونه انگل در تمام موارد آلوده Leishmania major تشخیص داده شد (تصاویر شماره ۱ و ۲).

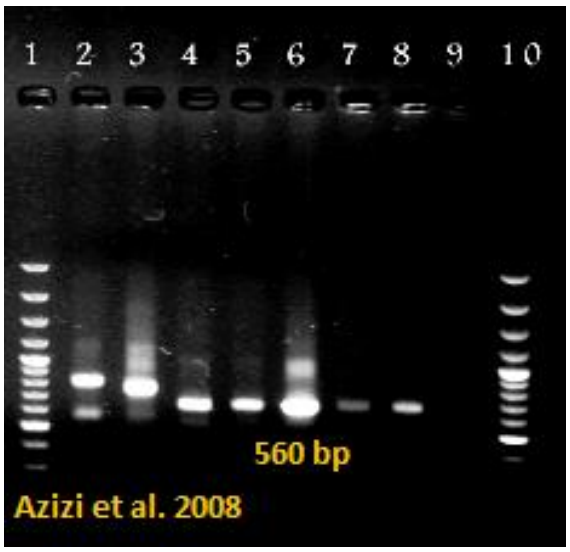
**جدول شماره ۱**- نتایج بررسی میکروسکپیک و مولکولی آلودگی لیشمانیایی گونه‌های پشه خاکی شهرستان جاسک، استان هرمزگان با تکنیک‌های Nested-PCR، ۸۷-۱۳۸۶

| گونه پشه خاکی | تعداد مورد مطالعه | تعداد و (درصد) موارد مثبت | |
|---|---|---|---|
| | | Nested-PCR با پرایمرهای CSB1XR و CSB2XF | Nested-PCR با پرایمرهای LINR4، LIN17 و LIN19 |
| فلبوتوموس پاپاتاسی | ۶۰ | ۳ (۵ ٪) | ۳ (۵ ٪) |
| فلبوتوموس صالحی | ۵۰ | ۲ (۴ ٪) | ۲ (۴ ٪) |
| سرژانتومیا تئودوری | ۴۰ | ۰ (۰ ٪) | ۰ (۰ ٪) |




**تصویر شماره ۱**- نتیجه الکتروفورز محصولات Nested-PCR نمونه‌های ماده پشه خاکی‌های فلبوتوموس پاپاتاسی و ف. صالحی با پرایمرهای CSB1XF، CSB2XR، LiR و 13Z در ژل آگاروز ۱/۵٪. سایز مارکر (ستون‌های ۹ و ۱)، استرین استاندارد لیشمانیا ماژور (۲)، استرین استاندارد لیشمانیا تروپیکا (۳)، استرین استاندارد لیشمانیا اینفانتوم (٤)، دو نمونه ف. پاپاتاسی (ستون‌های ٦ و ٥)، یک نمونه ف. صالحی (ستون ۷) و کنترل منفی (ستون ۸).

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]




تصویر شماره ۲: نتیجه الکتروفورز محصولات Nested-PCR نمونه‌های ماده پشه خاکی‌های فلبوتوموس پاپاتاسی و ف. صالحی با پرایمرهای LINR4، LIN17 و LIN19 در ژل آگاروز ۱/۵٪. سایز مارکر (ستون‌های ۱۰ و ۱)، استرین استاندارد لیشمانیا تروپیکا (۲)، استرین استاندارد لیشمانیا اینفانتوم (۳)، استرین استاندارد لیشمانیا ماژور (٤)، دو نمونه ف. پاپاتاسی (ستون‌های ۵ و ۵)، دو نمونه ف. صالحی (ستون‌های ۸ و ۷) و کنترل منفی (ستون ۹).

## بحث

در این مطالعه توصیفی مقطعی آلودگی پشه خاکی‌های مناطق آلوده شهرستان جاسک واقع در شرق استان هرمزگان به پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. افزایش تدریجی بروز موارد بیماری در چند ساله اخیر در این شهرستان بیانگر شکل‌گیری یک کانون اندمیک بود بطوری که در تقسیم بندی اپیدمیولوژیکی بیماری، این شهرستان با API>1/1000 جزء استراتوم یک قرار گرفته و مسؤولین بهداشتی استان را بر آن داشت تا در کنار اقدامات پیشگیرانه و کنترلی، مطالعاتی نیز به منظور شناسایی ناقلین و مخازن بیماری طرحریزی و اجرا گردد. در این مطالعه سه گونه فلبوتوموس صید گردید. هر چند بنظر می رسد تنوع گونه‌ای این جنس در شهرستان کم باشد ولی وفور این گونه‌ها در منطقه بسیار بالا بود بطوریکه دو گونه فلبوتوموس پاپاتاسی و ف. صالحی که در منطقه آلوده یافت شده و هر دو از ناقلین سالک مرطوب (ZCL) در مناطق مختلف کشور بوده‌اند، وفور بسیار بالایی داشته‌اند و هر دو نیز تمایلات‌اند و فیلیک و آنتروپوفیلیک نسبی داشته‌اند بطوری که ۴۱/۱۳ و ۳۷/۱۳ درصد صید این دو گونه از اماکن داخلی بوده و ۲۹/۶ و ۱۸ درصد آن‌ها نیز از انسان خون خورده بوده‌اند.

فلبوتوموس پاپاتاسی ناقل قطعی (Proven Vector) و اصلی (Primary Vector) سالک مرطوب در تمامی کانون‌های مطالعه شده در سراسر کشور بوده است (۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱). روش‌های تشخیصی میکروسکپیک، مولکولی و ایزوآنزیمی همگی مؤید نقش اصلی این گونه در انتقال Le. major به انسان نه تنها در ایران که در سایر کشورهای حوزه مدیترانه، آسیای مرکزی و شمال آفریقا بوده است (۴). این مسأله احتمالاً بخاطر یک تکامل متقابل (Co-evolution) دراز مدت بین این گونه و انگل مربوطه می‌باشد بطوریکه فقط مولکول‌های میدگات این گونه قادر به ایجاد زنجیره ارتباطی با لیپوفسفوگلیکانهای (LPG) لیشمانیا ماژور است (۲۵).

در مطالعات محدودی که در استان هرمزگان انجام شده نیز سلیمانی احمدی (۱۳۷۶) و حنفی بجد (۱۳۸۲) هر چند آلودگی لپتومونایی در نمونه‌های تشریح شده این گونه در شهرستان‌های بندرعباس (بخش کهورستان) و حاجی آباد پیدا نکردند ولی شواهد اپیدمیولوژیک آن‌ها را ناگزیر به معرفی این گونه به عنوان ناقل احتمالی (Probable Vector) بیماری نمود (۲۶،۲۷).

فلبوتوموس صالحی نیز تا کنون در سه کانون بعنوان ناقل احتمالی لیشمانیا ماژور معرفی شده است. کثیری و همکاران (۱۳۷۶) با تشریح نمونه‌هایی از این گونه در شهرستان چابهار استان سیستان و بلوچستان واقع در همسایگی کانون مورد بررسی در مطالعه حاضر، دو مورد آلودگی لپتومونایی گزارش نمودند (۱۴). نگارنده نیز در سال ۱۳۸۶ در مطالعه ناقلین بیماری کالاآزار

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

در شهرستان قیروکارزین استان فارس که از نظر بیوجغرافیایی شباهت زیادی به این کانون دارد، یک مورد آلودگی به ل. ماژور را با تکنیک مولکولی Nested-PCR مشاهده نمود (عزیزی و همکاران، اطلاعات در حال چاپ). در مطالعه‌ای دیگر در شهرستان جهرم استان فارس نیز قوامی و همکاران آلودگی این گونه به ل. ماژور را پیدا نموده‌اند (اطلاعات در حال چاپ).

در مطالعه حاضربا استفاده از دو تکنیک Nested-PCR آلودگی به انگل گونه Leishmania major در سه نمونه از گونه P. papatasi (۵٪) و دو مورد در گونه (P. 4 salehi٪) ثبت گردید. هر پنج نمونه آلوده از اماکن داخلی و یا لانه جوندگان مجاور منزل بیماران صید شده بودند. تکنیک‌های مولکولی استفاده شده در این تحقیق قبلاً بوسیله محققین دیگرو نگارندگان به دفعات برای تشخیص انگل لیشمانیا در بدن ناقلین و مخازن فرم‌های مختلف بیماری لیشمانیوز مورد استفاده قرار گرفته بود (۹،۱۰،۱۱،۱۶،۱۷،۱۸،۲۰).

از آنجا که تکنیک PCR قادر به تمایز میان آماستیگوتها و پروماستیگوتهای انگل نیست (۱۷،۲۸)، در این مطالعه جهت اطمینان از طی کامل و یا بخشی از چرخه زندگی انگل در بدن پشه خاکی‌های مورد بررسی، نمونه‌های پاروس و خالی از خون برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از نمونه‌های پاروس به این دلیل بود که این نمونه‌ها طول عمر کافی برای طی حداقل بخشی از چرخه انگل و تبدیل فرم آماستیگوت (که همراه با خون میزبان آلوده بلعیده می‌شود) به فرم پروماستیگوت را داشته‌اند و استفاده از نمونه‌های خالی از خون نیز به این دلیل بود که در این نمونه‌ها خ.ن بطور کامل هضم شده بود و چون آماستیگوتهای موجود در خون خورده شده از میزبان آلوده در معده پشه خاکی طی ۲۴ ساعت و قبل از تکمیل هضم خون به فرم پروماستیگوت تبدیل می شوند (۲۹)، لذا مشاهده DNA انگل لیشمانیا در چنین نمونه هایی بطور قطع مربوط به فرم پروماستیگوت انگل بوده و بطور قریب به یقین گونه آلوده مشاهده شده را می‌توان به عنوان ناقل بیماری معرفی نمود. لذا با توجه به یافته‌های این مطالعه از جمله مشاهده آلودگی لیشمانیایی در نمونه‌های دو گونه ف. پاپاتاسی و ف. صالحی، تعیین هویت این آلودگی به عنوان لیشمانیا ماژور، صید نمونه‌های آلوده از منازل بیماران و یا مخازن بیماری، تمایلات اندوفیلیک و انتروپوفیلیک این گونه‌ها، دو گونه مزبور به عنوان ناقلین بیماری سالک نوع مرطوب در این کانون نوظهور معرفی می‌شوند. شایان ذکر است مطالعه حاضر اولین مطالعه با استفاده از روش مولکولی PCR برای شناسایی آلودگی لیشمانیایی در بدن پشه خاکی‌ها و شناسایی ناقلین بیماری سالک در استان هرمزگان بوده است.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان و با شماره ۱۵۰۴۷/پ/۲۴ مورخ ۱۳۸۵/۱۲/۸ بوده و با حمایت مالی آن انجام شده است. نویسندگان از همکاری‌های بی دریغ مسؤولین مرکز بهداشت استان هرمزگان و شهرستان جاسک و بهورزان منطقه بخصوص آقای عبدالله زرین زاده کمال تشکر را دارند. از مسؤولین آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده بهداشت تهران بخصوص سرکار خانم دکتر حجاران بخاطر بررسی خون معده پشه خاکی‌ها با روش الیزا سپاسگزاری می‌گردد. مطالعات مولکولی این تحقیق در گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی شیراز انجام شده است.

## منابع

1. Yaghoobi-ershadi MR, Hakimiparizi M, Zahraei-Ramazani AR, Abdoli H, Akhavan AA, Aghasi M, Arandian MH, Ranjbar AA. Sand fly surveillance within an emerging epidemic focuses of cutaneous leishmaniasis in southeastern Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2010; 4: 17-23.
2. Sharma U, Singh S. Insect vector of Leishmania: distribution, physiology and their control. J. Vector Borne Dis. 2008; 45: 255-78.
3. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J. Med. Res. 2006; 123: 311-30.
4. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Medical and Veterinary Entomology. 1990; 4: 1-24.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clinical Dermatology. 1996; 14, 417-23.
6. Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. II. The human dis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1968; 62, 534-42.
7. Javadian E, Nadim A, Tahvildari-Bidruni HG, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. B. Khorassan. Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Isfarayen. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1976; 69: 140-3.
8. Yaghoobi-ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Jalali-Zand AR, Piazak N. Bionomics of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) in an Endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. J. Vector Ecol. 2004; 30: 115-18.

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

9. Parvizi P, Mauricio L, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of Leishmania major in peridomestic Phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran comparison of nested-PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Tropica. 2005; 93: 75-83.
10. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebali M, Mohtarami F, Salahi R. Molecular detection of Leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan province, Iran. Iranian J. Arthropod-Borne Dis. 2008; 2: 21-7.
11. Azizi K, Rassi Y, Momenbellah-Fard MD. PCR-based Detection of Leishmnia major kDNA within naturally infected Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae); the vector of Cutaneous Leishmaniasis, Southern Iran. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010; 104: 440-2.
12. Yaghoobi-ershadi MR, Javadian E, Tahvildari-Bidruni GH. The isolation of Leishmania major from Phlebotomus (Paraphlebotomus) caucasicus, in Isfahan province, Islamic Republic of Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1994; 88: 518-19.
13. Yaghoobi-ershadi MR, Javadian E, Tahvildari-Bidruni GH. Leishmania major MON-26 isolated from naturally infected Phlebotomus papatasi (Dip: Psychodidae) in Isfahan province, Iran. Acta Trop. 1995; 59: 279-82.
14. Kasiri H, Javadian E. The natural leptomonad infection of Phlebotomus papatasi and Phlebotomus salehi in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Sistan and Baluchestan province, south east of Iran. Iran J Public Health. 2000; 29:15-20.
15. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. Parasitol. Hum. Comp.1990; 65: 111-25.
16. Noyes HA, Reyburn H, Baiely JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 2877-81.
17. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied Environmental Microbiology. 2000; 66, 1933-8.
18. Momenbellah-Frad MD, Kalantari M, Rassi Y, Javadian E. The PCR-based detection of Leishmania major infections in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2003; 97: 811-16.
19. 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. Annals of Tropical Medicine and Parasitolog. 2006; 100, 63-8.
20. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershadi MR. First detection of leishmania infantum in Phlebotomus (Larroussius) major from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Fars province, south of Iran; Journal of Medical Entomology. 2008; 45: 726-31.
21. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96: 243-50.
22. Alexander B. sampling methods for Phlebotomine sand flies. Medical and Veterinary Entomology. 2000; 14, 109-122.
23. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae). Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology. 1982; 45: 121-209.
24. Smart J. A handbook for the identification of insects of medical importance, 4th Edition. London: British Museum (Natural History). 1965.
25. Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi, GB., Garraway, LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of Phlebotomine sand flies for different species of Leishmania in controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1994; 91: 9155-9.
26. Hanafi-Bojd AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Zamani Q, Barzehkar A, Jaafari R, Pourabazari GR. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in Hajiabad county, Hormozgan province, 2003. Hormozgan Medical Siences Journal. 2006; 10: 63-70.
27. Soleimani-Ahmadi M, Javadian E, Reisi A, Yaghoobi-Ershadi MR. Study on entomology fauna of Psychodidae in Kahurestan area, Bandar Abbas. Hormozgan Medical Siences Journal.1998; 2: 25-30.
28. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopina M, Marco JD, Barroso P, Gomez E, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Detection and identification of leishmania species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2005; 72, 87-93.
29. Molyneux DH, Ashford R W. The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals. London: Taylor & Francis. 1983.


[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]

**Iranian Journal of Epidemiology 2011; 7(3): 27-33.**
**Original Article**

# The Nested-PCR Based Detection of Cutaneous Leishmaniasis Vectors in Jask County, Hormozgan, Iran

Azizi K[1], Kalantari M[2], Fekri S[3]

1- Associate Professor, Department of Medical Entomology, Health Sciences Research Center, School of Health & Nutrition, Shiraz University of Medical Sciences, Iran.
2- MSc in Medical Entomology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Iran.
3- BSc in Diseases Control, Hormozgan Province Health Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandarabbas, Iran
**Corresponding author:** Azizi K, azizik@sums.ac.ir

**Background & Objectives:** The city of Jask in south east of Iran has been considered an endemic focus of leishmaniasis. PCR-based techniques can detect lower parasite burdens, reducing the number of false negatives and improving the quantification of Leishmania parasites in the sand fly. The aim of this epidemiological study was to detect vector(s) by PCR techniques in the city of Jask located in Hormozgan province.

**Methods:** Sand flies were captured using CDC miniature light traps and sticky papers during 2007-2008 and identified by their morphology. DNA extraction performed by Proteinase K and Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol methods. Leishmania kinetoplast minicircle DNA was amplified by two Nested-PCR techniques using species-specific primers (LINR4-LIN17-LIN19) and (CSB1XR-CSB2XF-LiR-13Z).These primers could differentiate among Leishmania species of Iran.

**Results:** A total of 8123 sand flies were collected. The fauna was identified as eight species (3 Phlebotomus and 5 Sergentomyia). Phlebotomus papatasi, P. salehi and Sergentomyia theodori were the three most dominant species (59.91%, 17.21% and 7.32% respectively).

60, 50 and 40 parous unfed female specimens of P. papatasi, P. salehi and S. theodori were investigated for Leishmania DNA infection. Leishmania major DNA was detected in 3 (5%) specimens of P. papatasi and 2 (4%) specimens of P. salehi. Anthropophilic index of these two species were 29.6 & 18 percent, respectively.

**Conclusion:** This study was the first molecular study for detection of cutaneous eishmaniasis vectors in Hormozgan province in Iran. According to the findings of the present study P. papatasi and P. salehi are probable vectors of cutaneous leishmaniasis in this focus.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis, Leishmania major, Phlebotomus papatasi, Phlebotomus salehi, Jask and Iran

[ Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-07-23 ]