مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۵، دی ۱۳۹۵، ۹۱۶-۹۰۳

تعیین گونه انگل لیشمانیا و فون پشه‌خاکی‌های شهرستان زیرکوه استان خراسان جنوبی

امین بهارشاهی[۱]، علیرضا کیخسروی[۲]، محمودرضا بهروان[۳]

دریافت مقاله: ۹۵/۸/٤ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۵/۸/۲۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۵/۱۰/۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/٤

چکیده

زمینه و هدف: بیماری لیشمانیازیس از مهم‌ترین بیماری‌های ناقل-زاد مشترک بین انسان و حیوان است که توسط گونه‌های پشه‌خاکی به انسان انتقال می‌یابد. مطالعه حاضر با هدف تعیین گونه پشه‌خاکی‌های شهرستان زیرکوه و تعیین گونه انگل لیشمانیا در پشه‌خاکی‌های این شهرستان با روش RFLP-PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها: صید پشه‌خاکی‌ها در تابستان ۱۳۹۴ با استفاده از تله چسبان انجام شد و نمونه‌های ماده صیدشده، ابتدا مونته شده و تعیین گونه شدند. پس از شناسایی پشه‌خاکی‌ها، DNA انگل جدا شد و سپس با استفاده از تکثیر ژن ITS-1 و با استفاده از روش RFLP-PCR اقدام به شناسایی انگل موجود در پشه‌خاکی‌ها گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه از مجموع ۴۶۰ عدد پشه‌خاکی جمع‌آوری‌شده، ۳۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق حیوانی و ۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق انسانی بودند. از مجموع ۱۱۰ پشه‌خاکی ماده، *Phlebotomus sergenti* با فراوانی ۵۹/۴۲٪ و *Sergentomyia sintoni* با فراوانی ۷/۲۵٪ گونه غالب منطقه گزارش شدند، همچنین در قسمت جداسازی انگل از پشه‌خاکی‌ها، یک مورد پشه‌خاکی *Ph. sergenti* آلوده به انگل شناسایی شد که با استفاده از تکنیک RFLP-PCR و روش هضم آنزیمی، انگل *Leishmania tropica* تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به حضور انگل *L. tropica* در منطقه و آلودگی پشه‌خاکی‌های *Ph. sergenti* به این انگل، شبکه بهداشت این شهرستان باید مراقبت‌های لازم در جهت کنترل بیماری لیشمانیازیس جلدی را مدنظر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: پشه‌خاکی، لیشمانیا، لیشمانیوز جلدی، زیرکوه

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۳- (نویسنده مسئول) کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، مربی گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
تلفن ثابت: ۳۲۳۹۵۴۴۱-۰۶۵، دورنگار: ۳۲۳۹۵۴۴۱-۰۶۵، پست الکترونیکی: mahmoodreza.behravan@yahoo.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

مقدمه

لیشمانیازیس از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی است که سازمان بهداشت جهانی (WHO) آن را جزو شش بیماری مهم مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا قرار داده و بخش بیماری‌های گرمسیری آن (TDR)، بیماری لیشمانیازیس را در گروه بیماری‌های نوپدید و کنترل‌نشده طبقه‌بندی کرده است [۲-۱]. لیشمانیازیس هم‌اکنون در ۹۸ کشور در قاره‌های آفریقا، آسیا، اروپا، آمریکای شمالی و جنوبی وجود دارد و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر این بیماری قرار دارند. به‌طورکلی، ۱۲ میلیون نفر در سرتاسر جهان به این بیماری مبتلا هستند که شامل افراد علامت‌دار و بی‌علامت می‌گردد [۳]. لیشمانیازیس جلدی شایع‌تر از انواع دیگر بوده به‌طوری‌که سالانه حدود ۱/۵ میلیون مورد جدید آن گزارش می‌شود. بیش از ۹۰ درصد این موارد در افغانستان، الجزایر، ایران، عراق، عربستان سعودی، سوریه، برزیل و پرو رخ می دهد [۴].

عامل بیماری لیشمانیازیس، یک انگل داخل سلولی اجباری است که ماکروفاژهای دخیل در سیستم ایمنی بدن را مورد حمله قرار می‌دهد. این انگل تاژک‌دار متعلق به جنس لیشمانیا، خانواده تریپانوزماتیده و زیرشاخه کینتوپلاستیدا است که برحسب محیط زندگی خود به دو شکل بی‌تاژک (آماستیگوت) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود [۸-۵]. ناقل بیماری، دوبالان خانواده Psycodidae (جنس *Phlebotomus* در دنیای قدیم و *Lutzomyia* در دنیای جدید)، معروف به پشه‌خاکی، می‌باشند. ۸۱ گونه و زیرگونه از پشه‌خاکی در انتقال حدود ۳۰ گونه انگل لیشمانیا به پستانداران دخیل هستند [۹، ۱]. در ایران تاکنون ۴۲ گونه پشه‌خاکی از ۲ جنس فلبوتوموس و سرژنتومیا شناسایی شده است. ناقلین این بیماری در کانون شمال غرب کشور پشه‌خاکی‌های فلبوتوموس پرفیلیوی (*Phlebotomus perfiliewi*) و فلبوتوموس کاندلاکی (*Ph. kandelakii*)، در کانون جنوب کشور فلبوتوموس الکساندری (*Ph. alexandri*)، فلبوتوموس ماژور (*Ph. major*) و فلبوتوموس کشیشیانی (*Ph.keshishiani*)، در کانون‌های مرکز کشور فلبوتوموس پاپاتاسی (*Ph. papatasi*) و در کانون شرق کشور فلبوتوموس سرژنتی (*Ph. sergenti*) هستند [۱۰].

ایران یکی از کانون‌های مهم لیشمانیازیس جلدی در دنیا تلقی می‌شود. در کشور ما، دو فرم لیشمانیازیس جلدی روستایی با عامل *Leishmania major* و لیشمانیازیس جلدی شهری با عامل *L. tropica* مشاهده می‌شود. این بیماری در حدود ۱۵ استان کشور به‌عنوان مشکل بهداشتی مطرح بوده و علی‌رغم اقدامات انجام‌شده برای کنترل آن، همچنان شاهد بروز این بیماری و افزایش کانون‌های آن در شهرهای مختلف کشور هستیم. کانون‌های شناخته‌شده نوع روستایی این بیماری از شهرهای اصفهان، ترکمن‌صحرا، نطنز، سرخس، لطف‌آباد، خوزستان، خراسان، شیراز و کاشان گزارش شده است و نوع شهری آن از شهرهای تهران، شیراز، کرمان، بم، مشهد، نیشابور، سبزوار، رفسنجان و خمینی‌شهر گزارش شده است [۱۱].

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در کشور ایران به روش مولکولی برای تشخیص و جداسازی انگل در پشه‌خاکی‌ها انجام گرفته است. به‌عنوان‌مثال عشاقی و همکاران، در سال ۱۳۸۷ در یک مطالعه مقطعی در ارزوئیه استان کرمان از مجموع ۱۷۲ عدد پشه‌خاکی ماده

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

صیدشده، ۹۲ عدد (۷۷٪) آنها را *Ph. papatasi* گزارش کردند و با تکنیک Semi-Nested-PCR انگل *L. major* را در ۶ عدد پشه‌خاکی (۶/۵٪ آلودگی پشه‌خاکی‌های آن منطقه) گزارش کردند [۱۲]. همچنین در مطالعه دیگری که کثیری و همکاران در سال ۱۳۹۱ در شهرستان چابهار انجام دادند، با استفاده از تکنیک PCR توانستند از تعداد ۶۶۷ پشه‌خاکی *Ph. papatasi* و ۴۶۵ عدد پشه‌خاکی *Ph. salehi*، به ترتیب تعداد ۱۴ و ۵ عدد پشه‌خاکی آلوده به انگل *L. major* را شناسایی و تشخیص دهند [۱۳].

گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا بیماری‌زایی و درمان متفاوتی دارند؛ ازاین‌رو، تشخیص سریع و دقیق گونه‌های مختلف انگل به‌منظور درمان مؤثرتر و اتخاذ روش‌های کنترلی مناسب‌تر، اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد [۱۴]. روش‌های مختلفی جهت شناسایی انگل لیشمانیا وجود دارد که از مهم‌ترین آنها مشاهده مستقیم انگل در ترشحات زخم، تعیین ایزوآنزیم‌ها، استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال و بررسی ژنوم انگل با استفاده از روش‌های مولکولی می‌باشد [۱۵]. استفاده از روش مولکولی در مطالعات مختلف برای تشخیص گونه انگل در سراسر دنیا رو به افزایش است و ما نیز در این مطالعه از این روش برای شناسایی و تعیین گونه انگل لیشمانیا در پشه‌خاکی‌های منطقه تحت مطالعه استفاده کردیم.

به‌منظور اجرای تدابیر کنترلی در منطقه جهت کاهش بروز بیماری، شناسایی دقیق گونه‌های ناقل بیماری، میزان آلودگی و پیک فعالیت پشه‌خاکی‌ها در طول سال اهمیت زیادی دارد [۱۶]. شناخت دقیق فون پشه‌خاکی‌های منطقه تحت مطالعه و همچنین نوع گونه انگل موجود در آنها در اتخاذ روش‌های کنترل مناسب‌تر بیماری، نقش بسزایی دارد و بستر مناسبی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در منطقه ایجاد می‌کند. ازاین‌رو، این مطالعه به‌منظور بررسی فون ناقلین بیماری لیشمانیازیس جلدی در شهرستان زیرکوه و تعیین گونه انگل آلوده‌کننده آنها به روش RFLP-PCR انجام گرفت تا یافته‌های این تحقیق برای برنامه‌های درمان بیماری و کنترل ناقلین لیشمانیازیس جلدی در سطح استان مورد استفاده قرار گیرد.

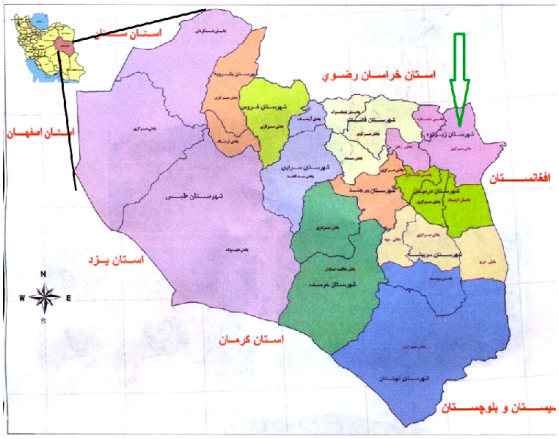
مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این یک مطالعه توصیفی به‌صورت مقطعی است که در مردادماه سال ۱۳۹۴ به‌منظور تعیین تنوع گونه‌ای پشه‌خاکی‌های فلبوتومینه و انگل لیشمانیای آلوده‌کننده آنها در شهرستان زیرکوه استان خراسان جنوبی انجام گرفت. شهرستان زیرکوه به مرکزیت شهر حاجی‌آباد، در شمال شرقی استان خراسان جنوبی واقع شده است (شکل ۱) و از دو قسمت دشتی و کوهستانی تشکیل شده است. این شهرستان دارای طول جغرافیایی ۲۰ درجه و ۶۰ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۲۳ دقیقه و ارتفاع از سطح دریای ۱۳۳۰ متر است. شهرستان زیرکوه از شمال به شهرستان خواف، از شرق به کشور افغانستان، از غرب به شهرستان قاین و از جنوب به شهرستان درمیان محدود می‌شود. جمعیت این شهرستان بالغ بر ۴۱۲۴۰ نفر می‌گردد. این شهرستان، دارای ۲ شهر (حاجی‌آباد و زهان)، ۳ بخش و ۶ دهستان و ۱۰۵ روستا است. آب‌وهوای شهرستان زیرکوه نیمه‌گرمسیری است و متوسط بارندگی آن در سال ۱۵۰ میلی‌متر و حداکثر و حداقل

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

درجهٔ حرارت آن به ترتیب ۳۸ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد است.



شکل ۱- نقشه جغرافیایی استان خراسان جنوبی، شهرستان زیرکوه با فلش مشخص شده است.

صید پشه‌خاکی‌ها و تعیین گونه آنها

برای انتخاب محل‌های تله‌گذاری و صید پشه‌خاکی‌ها، ابتدا ضمن تهیه نقشه کامل و دقیق منطقه و مشورت با کارشناسان مرکز بهداشت شهرستان زیرکوه در مورد گزارش موارد ابتلا به این بیماری، مسیرها و روستاهای موردنظر انتخاب شدند. صید و جمع‌آوری پشه‌خاکی‌ها با استفاده از تله‌های چسبان آغشته به روغن کرچک و طبق پروتکل مطالعات قبلی انجام شد [۱۷]. تله‌ها پیش از غروب آفتاب در مناطق داخلی و بیرونی منازل و محل‌های نگه‌داری احشام نصب شده و اویل صبح روز بعد جمع‌آوری می‌شدند. محل نصب تله‌ها در اماکن خارجی نظیر شکاف سنگ‌ها، حفرات حیوانات وحشی، شکاف دیوارها، لانه‌های جوندگان و ... بود. نمونه‌های صیدشده پس از چربی‌گیری توسط استون در ویال‌های حاوی الکل ۷۰٪ نگه‌داری شدند. جهت تشخیص پشه‌خاکی‌ها و برای مونتاژ دائم از محیط پوری استفاده شد. تعیین هویت گونه‌های پشه‌خاکی با بررسی آرماتورفارنژ و اسپرماتک ماده‌ها و همچنین بررسی دندان‌های سیباریوم و آرماتورهای حلقی و سایر ویژگی‌های مهم مرفولوژیک و بر اساس کلیدهای تشخیصی معتبر پشه‌خاکی‌ها صورت گرفت [۱۹-۱۸]. کلیه نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 ترسیم گردید.

استخراج و تکثیر DNA انگل لیشمانیا

پس از خرد کردن کامل پشه‌خاکی‌ها به کمک هاون شیشه‌ای، DNA انگل لیشمانیا (در صورت وجود) با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن و طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد و سپس با پرایمرهای اختصاصی LITSR و L5.8S، بخشی از ژن ITS-1 تکثیر شد. این پرایمرها قطعه‌ای به طول حدود ۳۶۰ bp را برای تمامی گونه‌های انگل لیشمانیا تکثیر می‌کنند و لذا جهت تعیین دقیق گونه انگل، از برش آنزیمی *Hae*III استفاده گردید [۲۰]. این آنزیم قطعه ۳۶۰ bp-۳۰۰ تکثیرشده را در انگل‌های *L.infantum*، *L. tropica* و *L. major* به ترتیب به قطعات (۲۰۰ bp، ۸۰ و ۶۰)، (۲۰۰ bp، ۶۰ و ۴۰) و (۲۲۰ bp و ۱۴۰) می‌شکند [۲۱]. برای تهیه ۲۵ میکرولیتر مواد لازم برای واکنش PCR از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده به اضافه یک میکرولیتر از پرایمر LITSR [5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'] و یک میکرولیتر از پرایمر L5.8S [5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'] به همراه ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۳ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، استفاده گردید. سپس میکروتیوب‌ها به‌منظور تکثیر بخشی از ژن ITS-1 انگل لیشمانیا به دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf مدل MultiGene™

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

Mini Personal ساخت کشور آلمان)، با شرایط دمایی زیر منتقل شد: الف) ۹۴ °C به‌مدت ۴ دقیقه برای جدا شدن رشته‌های الگو؛ ب) ۹۵ °C به‌مدت ۴۵ ثانیه؛ ج) ۵۵ °C به‌مدت یک دقیقه؛ د) ۷۲ °C به‌مدت یک دقیقه (مرحله ب تا د ۳۶ بار تکرار می‌شد)؛ و هـ) ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه برای اطمینان از ساخت کامل تمامی قطعات. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

انجام RFLP-PCR

برای انجام این واکنش طبق توصیه شرکت Fermentas، به ازای هر ۳۰ میکرولیتر از حجم واکنش، واکنشگرهای زیر با هم مخلوط می‌شوند: الف) ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR؛ ب) ۲ میکرولیتر از بافر مخصوص آنزیم؛ ج) ۱۷ میکرولیتر آب مقطر؛ و د) ۱ میکرولیتر از آنزیم *Hae*□□□ سریع‌الاثر. سپس مخلوط اصلی سانتریفیوژ کوتاه شده و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

پس از انجام واکنش RFLP برای تعیین گونه، مقدار ۱۳ میکرولیتر از محصول RFLP با ۱ میکرولیتر رنگ مخصوص لودکردن مخلوط شد و روی ژل آگارز ۳٪ با ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز شد.

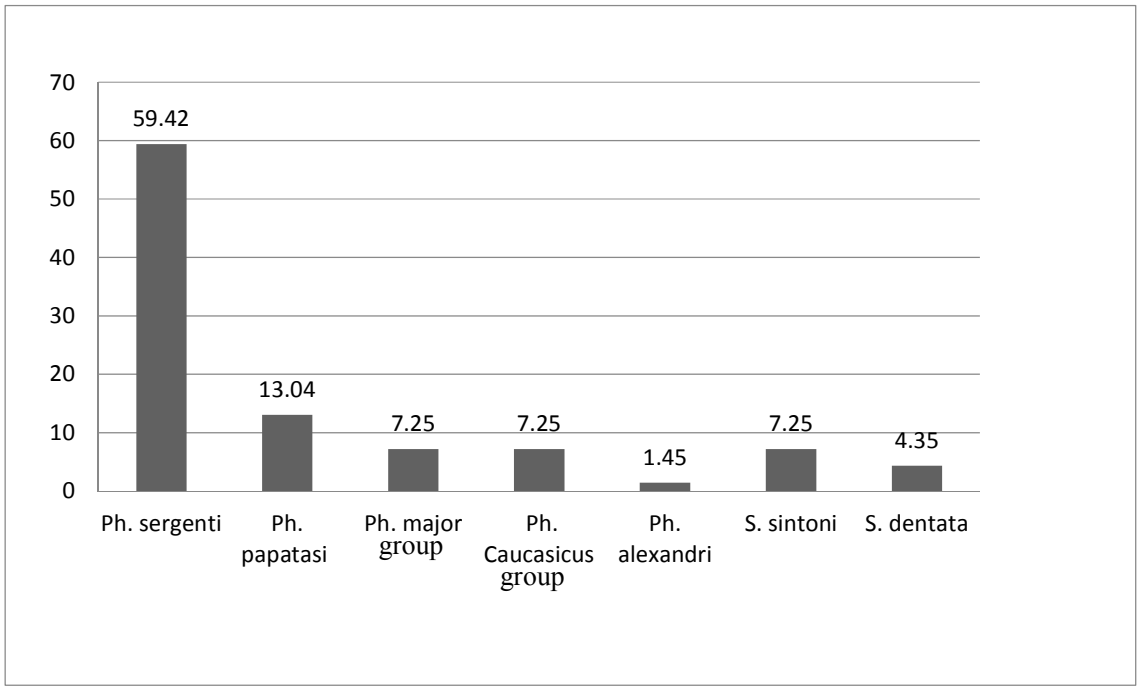
نتایج

در این مطالعه از مجموع ۴۶۰ نمونه پشه‌خاکی جمع‌آوری‌شده از مناطق انسانی و حیوانی، ۳۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق حیوانی و ۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق انسانی بودند. از این پشه‌خاکی‌ها ۱۱۰ عدد پشه‌خاکی ماده و ۳۵۰ عدد نر بودند. در این مطالعه، پشه‌خاکی‌های نر حذف شدند؛ چراکه خون‌خواری نمی‌کنند و در چرخه انتقال انگل دخالتی ندارند و در نتیجه فاقد اهمیت بیماری‌زایی‌اند. در مجموع، گونه‌های ماده شناسایی‌شده به دو جنس *Phlebotomus* و *Sergentomyia* تعلق داشتند؛ به‌طوری‌که ۸۸/۴۱٪ گونه‌ها متعلق به جنس *Phlebotomus* و ۱۱/۵۹٪ متعلق به جنس *Sergentomyia* بودند.

گونه‌های شناسایی‌شده متعلق به جنس *Phlebotomus* شامل *Ph. sergenti*، *Ph. papatasi*، *Ph. caucasicu* group، *Ph. major* group و *Ph. alexandri* بودند که در این بین *Ph. sergenti* با فراوانی ۵۹/۴۲ درصد بیشترین فراوانی را داشت و به‌عنوان گونه غالب شناسایی شد و همچنین گونه *Ph. alexandri* با فراوانی ۱/۴۵٪ کمترین فراوانی را داشت و گونه‌های *Ph. papatasi* با ۱۳/۰۴٪ و *Ph. caucasicus* group و *Ph. major* group هرکدام با ۷/۲۵ درصد در منطقه حضور داشتند. همچنین گونه‌های *S. sintoni* و *S. dentata* متعلق به جنس *Sergentomyia* هرکدام به ترتیب با فراوانی ۷/۲۵٪ و ۴/۳۵٪ در منطقه شناسایی شدند (نمودار ۱). از ۱۱۰ پشه‌خاکی ماده بررسی‌شده، ۵۴/۵۴ درصد دارای وضعیت شکمی خالی، ۲۰٪ باردار، ۶/۳۶٪ نیمه باردار و ۱۹/۰۹٪ خون‌خورده بودند. (جدول ۱ وضعیت شکمی نمونه‌های بررسی‌شده را به تفکیک نشان می‌دهد).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]



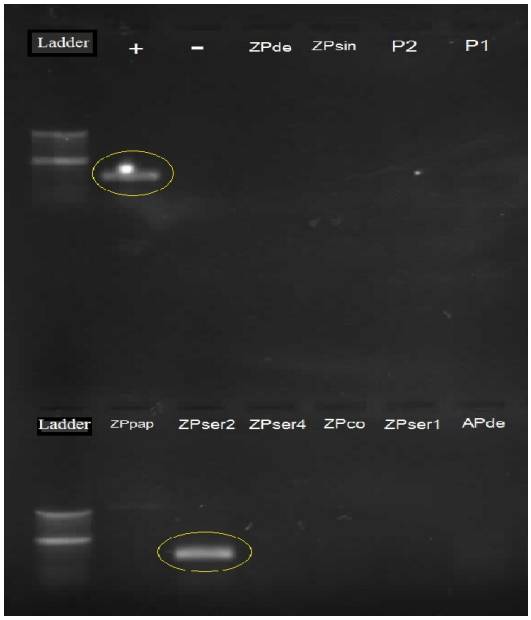
نمودار ۱- درصد فراوانی پشه‌خاکی‌های صیدشده در شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹٤

جدول ۱- وضعیت شکمی پشه‌خاکی‌های ماده بررسی‌شده در شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹٤

گونه پشه‌خاکی	وضعیت شکمی				تعداد	درصد
	باردار	نیمه باردار	خون خورده	خالی		
Ph. sergenti	۱۳(٪۲۰)	۵(٪۷/۶۹)	۱۵(٪۲۳/۰۷)	۳۲(٪۴۹/۲۳)	۶۵	۵۹/۴۲
Ph. papatasi	۵(٪۳۳/۳۳)	-	۵(٪۳۳/۳۳)	۵(٪۳۳/۳۳)	۱۵	۱۳/۰۴
Ph. caucasicus group	-	۱(٪۱۲/۵)	-	۷(٪۸۷/۵)	۸	۷/۲۵
Ph. major group	۱(٪۱۲/۵)	۱(٪۱۲/۵)	-	۶(٪۷۵)	۸	۷/۲۵
Ph. alexandri	-	-	۱(٪۱۰۰)	-	۱	۱/۴۳
S. sintoni	۲(٪۲۵)	-	-	۶(٪۷۵)	۸	۷/۲۵
S. dentate	-	-	-	۵(٪۱۰۰)	۵	۴/۳۵
جمع کل	۲۲(٪۲۰)	۷(٪۶/۳۶)	۲۱(٪۱۹/۰۹)	۶۰(٪۵۴/۵۴)	۱۱۰	۱۰۰

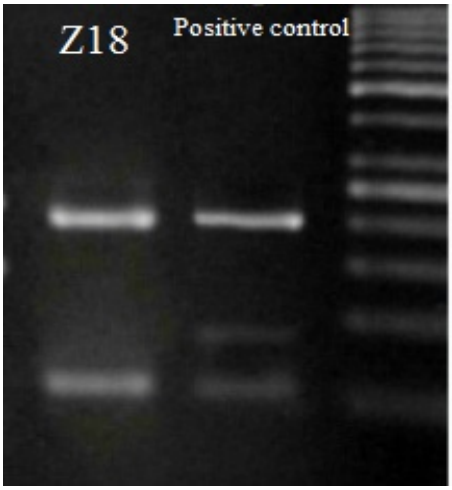
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

در این مطالعه در مجموع ۶۵ نمونه *Ph. sergenti* صید شد که مورد بررسی قرار گرفتند. در بین نمونه‌های بررسی‌شده تنها یک نمونه با نشان دادن باندی حدود ۳۶۰ bp از نظر وجود انگل مثبت تشخیص داده شد (شکل ۲). این نمونه متعلق به روستای فندخت شهرستان زیرکوه بود و از لحاظ وضعیت شکمی دارای شکم خالی بود. این روستا یکی از بزرگ‌ترین روستاهای شهرستان زیرکوه است و حدود ۱۴۳۰ نفر جمعیت دارد. در بین سایر پشه‌خاکی‌های صیدشده (*Ph.caucasicus* group، *Ph. papatasi* group، *Ph. major*، *Ph. Alexandri* و *S. dentata* و *S. sintoni*) نمونه آلوده به انگل یافت نشد.



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول ITS1- Leishmania-based PCR پشه‌خاکی Ph. sergenti در منطقه روستای فندخت شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹٤

هضم آنزیمی محصول ITS-1-PCR گونه *Ph. sergenti* آلوده به انگل لیشمانیا با آنزیم *Hae*III انجام گرفت و الگوی برش آنزیمی محصول PCR گونه *Ph. sergenti* آلوده به انگل، با الگوی برش انگل *L. tropica* مطابقت دارد و باندهای bp ۲۰۰، ۶۰ bp و ۴۰ bp به‌خوبی قابل‌مشاهده است (شکل ۳).



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصول RFLP-PCR نمونه مثبت انگلی پشه‌خاکی Ph. sergenti در منطقه روستای فندخت شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹٤

بحث

مشاهده آمار مربوط به مبتلایان لیشمانیازیس جلدی در شهرستان زیرکوه در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که هر سال حدود ۲۰-۳۰ نفر مبتلا به لیشمانیازیس جلدی به مرکز بهداشت این شهرستان مراجعه می‌کنند. این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع گونه‌ای ناقلین لیشمانیازیس جلدی و آلودگی آنها به انگل لیشمانیا در شهرستان زیرکوه شکل گرفت. لازم به ذکر است که مطالعه فون پشه‌خاکی‌ها و بررسی آلودگی آنها به انگل لیشمانیا در این شهرستان برای اولین بار صورت می‌گرفت.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

با توجه به اینکه انسان و حیوانات وحشی و اهلی متعددی به‌عنوان مخازن و میزبانان انگل لیشمانیا محسوب می‌شوند، تشخیص قطعی گونه‌های انگل جداشده با استفاده از روش‌های مختلف از این میزبانان و پشه‌های ناقل، نقش بسزایی در مطالعات انگل‌شناسی، بررسی‌های اپیدمیولوژیکی، درمان و کنترل بیماری دارد [۲۳-۲۲]. از گذشته تاکنون، به‌کارگیری روش‌های ایمونولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جهت تشخیص گونه‌های مختلف لیشمانیا مرسوم بوده است [۲۴]. در مطالعات مختلف، بسته به هدف مطالعه، از بخش‌های مختلف ژنوم انگل استفاده می‌شود. rDNA یکی از مناسب‌ترین بخش‌های ژنوم جهت تشخیص گونه‌های نزدیک به هم، یعنی گونه‌هایی که با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک نمی‌توان آن‌ها را از هم تمیز داد، می‌باشد. این قطعه شامل دو بخش غیر کدشونده به نام ITS-1 و ITS-2 است. بر اساس مطالعات انجام‌شده، در این دو قطعه به‌ویژه ITS-1، به حد کافی تنوع در بین گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا وجود دارد که بتوان از آنها جهت شناسایی گونه‌های انگل بهره جست [۲۶-۲۵]. چون هدف از این مطالعه تعیین گونه انگل لیشمانیا در پشه‌خاکی‌ها بود، از تکثیر ژن ITS-1 و هضم محصول PCR با آنزیم *Hae*□□ جهت تعیین گونه انگل استفاده گردید. مطالعات حشره‌شناسی این تحقیق که در سال ۱۳۹۴ در فصل فعالیت پشه‌خاکی‌ها صورت گرفت، منجر به صید پشه‌خاکی‌ها از ۷ گونه مختلف شد. گونه غالب در جنس فلبوتوموس، گونه *Ph. sergenti* است که ناقل قطعی لیشمانیازیس پوستی شهری در تمام کانون‌های بیماری در ایران می‌باشد، آلودگی انگلی این پشه‌خاکی از مشهد، سبزوار، یزد، قم، زاهدان، کرمان، شیراز و بندرعباس گزارش شده است.

در مطالعه که توسط یوسف مقدم و همکاران در استان خراسان جنوبی انجام گرفته است، از مجموع ۱۷۴ عدد پشه‌خاکی که از سطح برخی شهرستان‌های استان خراسان جنوبی جمع‌آوری کردند، توانستند گونه‌های *Ph. sergenti*، *Ph. papatasi*، *S. sintoni* و *S. dentate* را شناسایی کنند، به‌طوری‌که این یافته به علت شرایط تقریباً مشابه اکولوژیکی کل استان خراسان جنوبی با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد [۲۷]. برنجی و همکاران در مطالعه‌ای که در شمال مشهد انجام دادند، گونه‌های *Ph. sergenti*، *Ph. papatasi*، *S. sintoni* و *S. sumbarica* را شناسایی کرده و گونه غالب را *Ph. sergenti* گزارش کردند [۱۰]. این نتایج شباهت زیادی به نتایج مطالعه حاضر دارد و احتمالاً مهم‌ترین دلیل این شباهت گونه‌ای را می‌توان به شرایط آب‌وهوایی تقریباً یکسان مناطق مختلف استان خراسان جنوبی و رضوی به مناطق مورد مطالعه ما نسبت داد که این مسئله، شرایط مشابهی را در جهت ایجاد ساختار گونه‌ای یکسان در این مناطق به وجود آورده است. همچنین مهرابی توانا و همکاران نیز در مطالعه خود در شهرستان تایباد در استان خراسان رضوی در سال ۱۳۸۳ نشان دادند که گونه *Ph. Sergenti*، گونه غالب منطقه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

مـی‌باشـد [۲۸]. امـا در مطالعـه مشـابهی کـه بهـروان و همکاران در شهرسـتان ورامـین انجـام دادنـد، گونـه *Ph. papatasi* را گونـه غالـب معرفـی کردنـد [۲]، همچنـین کثیـری و همکـاران در مطالعـه‌ای مشـابه در شهرسـتان چابهـار، گونـه غالـب منطقـه را *Ph. papatasi* گـزارش کردنـد [۱۲] کـه ایـن یافتـه‌هـا بـا مطالعـه حاضـر هم‌خوانی ندارنـد و مـی‌تـوان ایـن‌گونـه گفـت کـه تفـاوت در فـون و گونـه پشـه‌خـاکی غالـب در ایـن منـاطق مـی‌توانـد بـه علـت تفـاوت در شـرایط آب‌وهـوایی و همچنـین نـوع بیمـاری لیشـمانیازیس در منـاطق مـذکور باشد.

در مطالعـه کرمیـان و همکـاران کـه در سـال ۱۳۹۲ بر روی نمونه‌های ضـایعات جلـدی بیمـاران مشـکوک بـه لیشـمانیازیس جلـدی در شهرسـتان بیرجنـد انجـام گرفـت، بـرای شناسـایی انگـل توسـط روش مولکـولی و تعیـین گونـه آن بـه روش RFLP-PCR از ژن‌هـای KDNA و ITS-1 اسـتفاده شـد و از مجمـوع ۸۰ بیمـار مبـتلا بـه لیشـمانیازیس جلـدی، ۸ بیمـار (۱۰٪) مبـتلا بـه *L. major* (نـوع روسـتایی) و ۷۲ بیمـار (۹۰٪) مبـتلا بـه *L. tropica* (نـوع شـهری) بودنـد، همچنـین آنهـا توصـیه کردنـد کـه روش RFLP-PCR روی قطعـه ITS-1 دارای حساسـیت کامـل اسـت و مـی‌توانـد بـرای تشخیص لیشـمانیازیس و تعیـین سـریع گونـه انگـل‌هـای عامل بیماری بـه‌کـاررود [۲۹]. در همـین راسـتا، مـا نیـز از ژن ITS-1 بـرای شناسـایی انگـل در پشـه‌خـاکی‌هـا و سـپس تعیـین گونـه آن بـه روش RFLP-PCR اسـتفاده کـردیم و موفـق بـه تشـخیص انگـل *L. tropica* در بـدن پشـه‌خـاکی *Ph. sergenti* کـه گونـه غالـب در شهرسـتان زیرکوه است، شدیم.

نتیجه‌گیری

بـا توجـه بـه مقایسـه نتـایج مطالعـه حاضـر و مطالعـه کرمیـان و همکـاران مـی‌تـوانیم نتیجـه گرفـت کـه زخم‌هـای بیمـاران مبـتلا بـه لیشـمانیازیس جلـدی نـوع شـهری مـی‌توانـد بـر اثـر انتقـال بـومی بیمـاری در ایـن شهرسـتان ایجـاد شـده باشـد. امـا بیمـارانی کـه دارای زخـم‌هـای مربـوط بـه *L. major* (نـوع روسـتایی) بودنـد بر اثر مسـافرت بـه اسـتان‌هـای دیگـر و منـاطق انـدمیک نوع روستایی بیمـاری، مبـتلا بـه آن شـده‌انـد و بـا توجـه بـه درصـد پـایین پشـه‌خـاکی *Ph. papatasi* (۷/۹۵) در فون منطقه و فقـدان انگـل در بـدن آنهـا مـی‌تـوان گفـت کـه در شهرسـتان بیرجنـد انتقـال بـومی انگـل *L. major* وجود ندارد.

این بررسی اولین مطالعه مولکولی به‌منظور تعیین گونه انگل لیشمانیا در پشه‌خاکی‌های شهرستان زیرکوه استان خراسان جنوبی بود و نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، نشان داد که لیشمانیازیس جلدی نوع شهری می‌تواند در آینده در این شهرستان به‌عنوان یک معضل بهداشتی مطرح شود. این امر را می‌توان به سبک زندگی روستایی مردم این شهرستان، مهاجرت افراد غیرمصون یا بیمار به منطقه، وجود محل‌های مناسب برای زادوولد پشه‌خاکی‌ها، وفور بالای پشه‌خاکی *Ph. sergenti* و رواج فعالیت‌های کشاورزی و دامداری که زمینه را برای افزایش جمعیت جوندگان و در پی آن سگ‌سانان که میزبان ثانویه انگل لیشمانیا به‌شمار می‌روند، مرتبط دانست. در پایان پیشنهاد

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

می‌شود سیستم بهداشتی این شهرستان به‌منظور کنترل و پیشگیری از شیوع بیماری لیشمانیازیس جلدی در منطقه، مراقبت‌های لازم جهت کنترل این بیماری و همچنین آموزش بهداشت و اقدامات بهداشت محیط را مدنظر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان محترم معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و مسئولان آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه به خاطر مساعدت در انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Zamen Momeni A. *Leishmania* parasite and leishmaniasis. 3th ed. Tehran: *Tehran University Publication Center*: 2008. [Farsi] Moddabber F. Leishmaniasis. TDR Progress. 11th Program report: 1991-1992.

[2] Behravan MR, Hajjaran H, Abadi A, Haghighi A, Rahbarian N, Amini A, et al. Cutaneous leishmaniasis in suspected refereed patients to health centers of Varamin and determination of sand flies species during 2012-2013. *Medical Journal of Tabriz university of medical sciences and health services* 2015; 37(2): 6-11. [Farsi]

[3] World Health Organization. Leishmaniasis: world wide epidemiological and drug access update 2013.

[4] Hamzavi Y, Mohebali M, Edrisian GH, Foruzani A. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis (human being and animal reservoir) in Dashestan and Dashti districts of Bushehr province, Iran. *J Publ Hlth* 2000; 29(14): 177-190. [Farsi]

[5] Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin Dermatol* 1997; 17: 317-325.

[6] WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases 2010.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

[7] Heinzel F. From oriental sore to kala azar. *J. Clin Microbial* 1997; 19: 121-126.

[8] Bastien P, Lachaud L, Marchergui S, Chabbert E, Dereure J, Pierr J. Comparison of six PCR method using Peripheral Blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin Microbiolo* 2002; 40(1): 310-315.

[9] Oshaghi MA, Yaghoobi-Ershadi MR, Abbassi M, Parvizi P, Akhavan AA, et al. Detection of *Leishmania major* in naturally infected sand flies using Semi Nested- PCR. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(4): 59-64.

[10] Berenji F, Yaghoubie M, Akhavan A A, Hanafi B A, Fata A. A Study on the vectors of the cutaneous leishmaniasis in the northrnpart of mashhad Iran. *Iranin journal of basic medical sciences* 2006: 1-6. [Farsi]

[11] Sofizadeh A, Cherabin M, Mehravaran A. Cutaneous leishmaniasis in Gonbad Kavoos, North of Iran (2009-11): an epidemiological study. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 2012; 14(4): 100-6. [Farsi]

[12] Kassiri H, Naddaf SR, Mohebali M, Javadian E. Molecular characterization of *Leishmania* infection in sand flies from Sistan Va Baluchistan province, southeastern Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2012; 5(2): 430-433. [Farsi]

[13] Berman JD. Human leshmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 684-703.

[14] Hatam GR, Ardehali S, Motazedian H, Sadjjadi SM, Fakoorziba MR. The methods of isolation and characterzation of *Leishmania* parasite. Shiraz. Publisher of shiraz Univercity 2006; 172. [Farsi]

[15] Killick-kendrick R. Phlepotominae vectors of leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4: 1-24

[16] Parvizi P, Benlarbi M, Ready PD. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and veterinary entomology* 2003; 17(4): 351-62.

[17] Rassi Y, Hanafi bojd AA. Sand fly, The vector of leishmaniasis. Tehran: Noavaran Elm 2006. [Farsi]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

[18] Seyedi-Rashti MA, Nadim A. The genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the countries of the eastern Mediterranean region. *Iranian J Publ Health* 1992; 21(1-4): 11-50.

[19] Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). 1982: 121-209.

[20] Al‐Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, et al. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Tropical Medicine & International Health* 2004; 9(7): 812-6.

[21] Al-Nahhas SA, Kaldas RM. Characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous human samples from central region of Syria by RFLP analysis. *ISRN Parasitol* 2013; 3: 5-11

[22] Lainson R, Shaw JJ, Peters W, Killick-Kendrick R. Evolution, classification and geographical distribution. *Academic Press* 1987: 1-20.

[23] Croft SL, Yardely V, Hendrick, Drug sentivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Trans of the Royal Soci of Trop Med and Hyg* 2012: 127-129.

[24] Karami M, Doudi M, Setorki M. Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan. *Iran. J Vector Borne Dis* 2013; 50: 30-37.

[25] El Tai NO, Osman OF, Fari M EI, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(5): 575-79.

[26] Schonian G, Nasereddin D, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(1): 349-58.

[27] Mogaddam MY, Borna H, Shayesteh M, Davari A, Younesi Z, Hanafi-Bojd AA, et al. Fauna and frequency of sand flies in Southern Khorasan province. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences (JMUMS)* 2015; 25(125): 121-30. [Farsi]

[28] Mehrabi-Tavana A, Javadian E, Rassi Y, Nakhkaei H, Zahraei A, Khoobdel M, et al.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

identification of cutaneous leishmaniasis agents in Birjand, Iran. *Journal of Birjand University of Medical Sciences* 2013; 20(2): 183-90. [Farsi]

[29] Karamian, M., Bojd, F., Sedigh, M., Hemmati, M., Saadatjoo, A., & Barati, D. A. Molecular Ecological characteristics of the sand fly, vector of cutaneous leishmaniasis in Taibad city bordering of Iran and Afghanistan. *J Mil Med* 2005; 6(4): 255-62.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]

Identification of *Leishmania* Parasites and Sandflies Fauna in Zirkouh City, Khorasan-e-Jonoobi Province

A. Baharshahi[1], A.R. Keikhosravi[2], M. Behravan[3]

Received: 25/10/2016 Sent for Revision: 12/11/2016 Received Revised Manuscript: 21/12/2016 Accepted: 24/12/2016

Background and Objective: Leishmaniasis is one of the most important vector-borne zoonosis that transmits to human by sand fly species. The current study was carried out to identify sand fly species in Zirkooh, Khorasan-e-Jonobi Province. It was also aimed to determine *Leishmania* species in infected sand flies by RFLP-PCR method.

Materials and methods: Sand fly specimens were collected by using sticky traps and mechanical aspirator from different parts of Zirkooh city during summer 2015. Captured females were first mounted and then were identified at species level. DNA of the parasite was isolated using extraction kit. The gene ITS-1 was amplified using the parasite specific primers and then RFLP-PCR method was used to identify them.

Results: In this study, a total of 460 specimens were collected, of which 380 sand flies collected from animal facilities and 80 sand flies from residential areas. The most prevalent species, out of 110 females in total, was *Phlebotomus sergenti* (59.42%) and the second most prevalent was *Sergentomyia sintoni* (7.25%). Among the examined sandflies, only one specimen belonged to *Phlebotomu sergenti* was infected with *Leishmania tropica*; identified by RFLP-PCR.

Conclusion: Considering the presence of *Ph. sergenti*, as the dominant species in the region, which is component of disease vectors of the urban type of cutaneous leishmaniasis and the presence of *Leishmania tropica* in the region, the city's health system must take a necessary action for controlling cutaneous leishmaniasis.

Key words: Sand flies, *Leishmania*, Cutaneous Leishmaniasis, Zirkooh

Funding: This research was funded by Birjand University of Medical Sciences, Iran

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Birjand University of Medical Sciences, approved the study.

How to cite this article: Baharshahi A, Keikhosravi AR, Behravan M. Identification of *Leishmania* Parasites and Sandflies Fauna in Zirkouh City, Khorasan-e-Jonoobi Province. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 15(10): 903-16. [Farsi]

1- MSc in Animal Science, Dept. of Biology, Faculty of Basic Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Basic Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
3- Instructor in Medical Parasitology, Dept. of Microbiology & Birjand Infectious Diseases Research Center, Faculty of Paramedicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
(Corresponding Author): Tel: (056) 32395441, Fax: (056) 32395441, E-Mail: mahmoodreza.behravan@yahoo.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1395.15.10.5.8]