

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

امین بهارشاهی^۱، علیرضا کینخسروی^۲، محمودرضا بهروان^۳

دریافت مقاله: ۹۵/۸/۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۵/۸/۲۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۵/۱۰/۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۴

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 جمع‌آوری شده، 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: ۰۶۵-۳۲۳۹۵۴۴۱، دورنگار: ۰۶۵-۳۲۳۹۵۴۴۱، پست الکترونیکی: mahmoodreza.behravan@yahoo.com

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 [۱-۲]. 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. به‌طور کلی، 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 می‌دهد [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 [۵-۸]. ناقل بیماری، دو بالان خانواده Psychodidae (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. به‌عنوان مثال عشاقی و همکاران، در سال ۱۳۸۷ در یک مطالعه مقطعی در ارزوئیه استان کرمان از مجموع ۱۷۲ عدد پشه‌خاکی ماده

بسازی دارد و بستر مناسبی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در منطقه ایجاد می‌کند. از این‌رو، 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

صیدشده، ۹۲ عدد (۰/۷۷٪) 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؛ از این‌رو، 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.

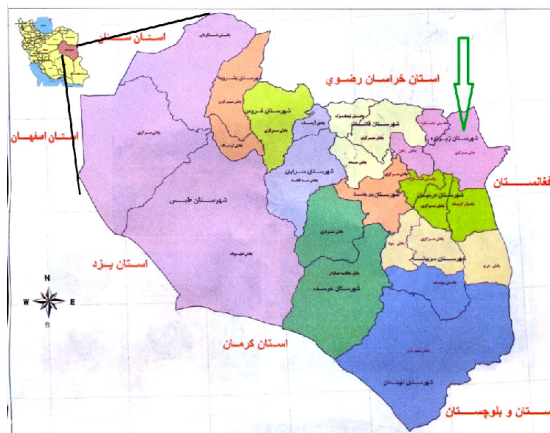
به‌منظور اجرای تدابیر کنترلی در منطقه جهت کاهش بروز بیماری، شناسایی دقیق گونه‌های ناقل بیماری، میزان آلودگی و پیک فعالیت پشه‌خاکی‌ها در طول سال اهمیت زیادی دارد [۱۶]. شناخت دقیق فون پشه‌خاکی‌های منطقه تحت مطالعه و همچنین نوع گونه انگل موجود در آنها در اتخاذ روش‌های کنترل مناسب‌تر بیماری، نقش

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 لیثمانیا

پس از خرد کردن کامل پشه‌خاکی‌ها به کمک هاون شیشه‌ای، DNA انگل لیثمانیا (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 لیثمانیا تکثیر می‌کنند و لذا جهت تعیین دقیق گونه انگل، از برش آنزیمی *HaeIII* استفاده گردید [۲۰]. این آنزیم قطعه ۳۶۰-۳۰۰ bp تکثیرشده را در انگل‌های *L. infantum*، *L. tropica* و *L. major* به ترتیب به قطعات (۲۰۰، ۸۰ و ۶۰)، (۲۰۰، ۲۰ و ۶۰) و (۴۰ و ۲۲۰ 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'-CTGGATCATTTCCGATG-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 لیثمانیا به دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf مدل MultiGene™

درجه 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 اوایل 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 اسپرما تک ماده‌ها و همچنین

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 شناسایی شده 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 شناسایی شده متعلق به جنس *Phlebotomus* شامل *Ph. caucasicu*، *Ph. papatasi*، *Ph. sergenti* 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. dentata* و *S. sintoni* متعلق به جنس *Sergentomyia* هرکدام به ترتیب با فراوانی ۷/۲۵٪ و ۴/۳۵٪ در منطقه شناسایی شدند (نمودار ۱). از ۱۱۰ پشه‌خاکی ماده بررسی شده، ۵۴/۵۴ درصد دارای وضعیت شکمی خالی، ۲۰٪ باردار، ۶/۳۶٪ نیمه باردار و ۱۹/۰۹٪ خون‌خورده بودند. (جدول ۱ وضعیت شکمی نمونه‌های بررسی شده را به تفکیک نشان می‌دهد).

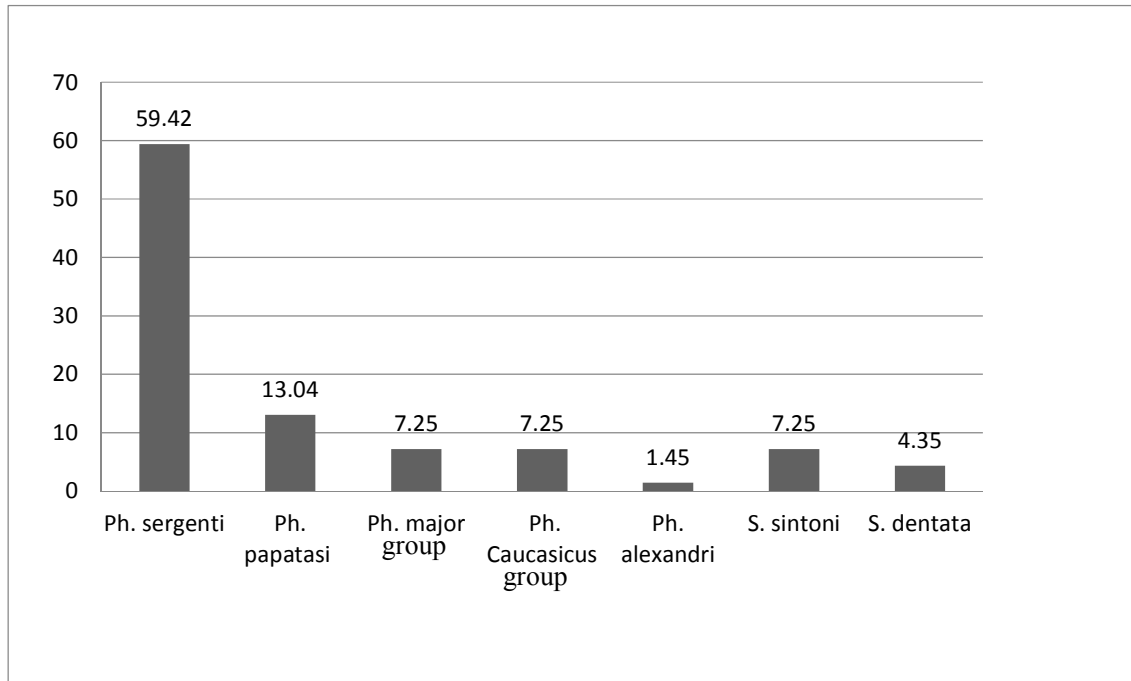
Mini Personal ساخت کشور آلمان، با شرایط دمایی زیر منتقل شد: الف) °C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه برای جدا شدن رشته‌های الگو؛ ب) °C ۹۵ به مدت ۴۵ ثانیه؛ ج) °C ۵۵ به مدت یک دقیقه؛ د) °C ۷۲ به مدت یک دقیقه (مرحله ب تا د ۳۶ بار تکرار می‌شد)؛ و ه) °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه برای اطمینان از ساخت کامل تمامی قطعات. سپس محصولات 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 *HaeIII* سریع‌الاثرب. سپس مخلوط اصلی سانتریفیوژ کوتاه شده و نمونه‌ها به مدت 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 جمع‌آوری شده از مناطق انسانی و حیوانی، ۳۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق حیوانی و ۸۰ پشه‌خاکی مربوط به مناطق

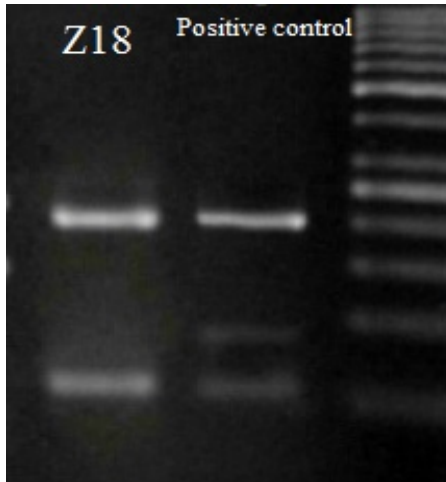


نمودار ۱- درصد فراوانی پشه‌خاکی‌های صیدشده در شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹۴

جدول ۱- وضعیت شکمی پشه‌خاکی‌های ماده بررسی‌شده در شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹۴

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

HaeIII انجام گرفت و الگوی برش آنزیمی محصول PCR گونه *Ph. sergenti* آلوده به انگل، با الگوی برش انگل *L. tropica* مطابقت دارد و باندهای ۲۰۰ bp، ۶۰ bp و ۴۰ bp به خوبی قابل مشاهده است (شکل ۳).



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصول RFLP-PCR نمونه مثبت انگلی پشه‌خاکی *Ph. sergenti* در منطقه روستای فندخت شهرستان زیرکوه در سال ۱۳۹۴

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 به منظور 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.

در این مطالعه در مجموع ۶۵ نمونه *Ph. sergenti* صید شد که مورد بررسی قرار گرفتند. در بین نمونه‌های بررسی شده تنها یک نمونه با نشان دادن باندهای 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*، *Ph. major* group، *Ph. papatasi* group 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 ۱۳۹۴
هضم آنزیمی محصول ITS-1-PCR گونه *Ph. sergenti* آلوده به انگل لیشمانیا با آنزیم

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 [۲۲-۲۳]. 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 [۲۵-۲۶]. چون هدف از این مطالعه تعیین گونه انگل لیشمانیا در پشه‌خاکی‌ها بود، از تکثیر ژن ITS-1 و هضم محصول PCR با آنزیم *HaeIII* 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 فلپوتوموس، 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*، *S. 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 مهربانی 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

پشه‌خاکی *Ph. sergenti* که گونه غالب در شهرستان زیرکوه است، شدیم.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقایسه نتایج مطالعه حاضر و مطالعه کرمان و همکاران می‌توانیم نتیجه گرفت که زخم‌های بیماران مبتلا به لیشمانیازیس جلدی نوع شهری می‌تواند بر اثر انتقال بومی بیماری در این شهرستان ایجاد شده باشد. اما بیمارانی که دارای زخم‌های مربوط به *L. major* (نوع روستایی) بودند بر اثر مسافرت به استان‌های دیگر و مناطق اندمیک نوع روستایی بیماری، مبتلا به آن شده‌اند و با توجه به درصد پایین پشه‌خاکی *Ph. papatasi* (۷/۹۵) در فون منطقه و فقدان انگل در بدن آنها می‌توان گفت که در شهرستان بیرجند انتقال بومی انگل *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

می‌باشد [۲۸]. اما در مطالعه مشابهی که به‌روان و همکاران در شهرستان ورامین انجام دادند، گونه *Ph. papatasi* را گونه غالب معرفی کردند [۲]. همچنین کثیری و همکاران در مطالعه‌ای مشابه در شهرستان چابهار، گونه غالب منطقه را *Ph. papatasi* گزارش کردند [۱۲] که این یافته‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارند و می‌توان این‌گونه گفت که تفاوت در فون و گونه پشه‌خاکی غالب در این مناطق می‌تواند به علت تفاوت در شرایط آب‌وهوایی و همچنین نوع بیماری لیشمانیازیس در مناطق مذکور باشد.

در مطالعه کرمان و همکاران که در سال ۱۳۹۲ بر روی نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران مشکوک به لیشمانیازیس جلدی در شهرستان بیرجند انجام گرفت، برای شناسایی انگل توسط روش مولکولی و تعیین گونه آن به روش RFLP-PCR از ژن‌های *ITS-1* و *KDNA* استفاده شد و از مجموع ۸۰ بیمار مبتلا به لیشمانیازیس جلدی، ۸ بیمار (۱۰٪) مبتلا به *L. major* (نوع روستایی) و ۷۲ بیمار (۹۰٪) مبتلا به *L. tropica* (نوع شهری) بودند، همچنین آنها توصیه کردند که روش RFLP-PCR روی قطعه *ITS-1* دارای حساسیت کامل است و می‌تواند برای تشخیص لیشمانیازیس و تعیین سریع گونه انگل‌های عامل بیماری به‌کار رود [۲۹]. در همین راستا، ما نیز از ژن *ITS-1* برای شناسایی انگل در پشه‌خاکی‌ها و سپس تعیین گونه آن به روش RFLP-PCR استفاده کردیم و موفق به تشخیص انگل *L. tropica* در بدن

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.

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.

References

- [1] Nadim A, Javadian E, Mohebbali M, Zamen Momeni A. *Leishmania* parasite and leishmaniasis. 3th ed. Tehran: *Tehran University Publication Center*; 2008. [Farsi]
- [2] Behravan MR, Hajjaran H, Abadi A, Haghghi 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, Mohebbali 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.

- [7] Heinzel F. From oriental sore to kala azar. *J. Clin Microbiol* 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, Yaghoobie 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, Mohebbali 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. Phlebotominae 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]

- [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] AlJawabreh 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, Nakhkai H, Zahraei A, Khoobdel M, et al.

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.

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

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

A. Baharshahi¹, A.R. Keikhosravi², M. Behravan³

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 Zirkouh, Khorasan-e-Jonoobi 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 Zirkouh 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 *Phlebotomus 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, Zirkouh

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