طب‌نظامی
پاییز ۱۳۸٤، شماره ۷ (۳)
صفحات: ۲۵۲-۲٤۵

بررسی ژنتیکی پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی، ناقل اصلی لیشمانیا میجر، بر اساس مارکرهای ژنتیکی و تنوع هاپلوتایپ‌های DNA در مناطق مختلف ایران

پرویز پرویزی [۱] *Ph.D. و نسرین باغبان [۲] **M.Sc.

*آدرس مکاتبه: * انستیتو پاستور ایران – آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی – بخش انگل شناسی – تهران – ایران*

*** دبیر کل آموزش و پرورش شهرستان‌های استان تهران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۶/۲۸ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۹/۲۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۱۰/۲۰

خلاصه

مقدمه: پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی ماده، ناقل اصلی انگل لیشمانیا میجر، عامل بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران است. داشتن دانش و آگاهی از تغییرات ژنتیکی و جمعیتی پشه خاکی‌ها, برای هر نوع برنامه تحقیقاتی روی انتقال بیماری لیشمانیوز و کنترل آن مفید خواهد بود. ژن سیتوکروم بی و ژن رمزگذاری پروتئین هسته‌ای و همچنین ژن پروتئین سطحی باکتری *wolbachia* (ولباکیا) به‌عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفتند.

روش کار: از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و آسپیراتور جهت صید پشه خاکی‌ها از مناطق مورد مطالعه در ایران استفاده شد. هر پشه خاکی در روی یک قطره 1 x TE در روی اسلاید تمیز زیر لوپ قرار داده شده، سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا و مابقی جهت جدا کردن DNA تشریح و برای هر پشه از هر دو پرایمر جهت تعیین توالی استفاده شد.

نتایج: سه قطعه از سیتوکروم بی با PCR تکثیر و تعیین توالی شدند. در قطعه CB1 از میان ۱۸۹ توالی، ۳۳ هاپلوتایپ، قطعه CB3 از میان ۴۴ توالی، ۷ هاپلوتایپ و قطعه Cyt b Long از میان ۱۴۹ توالی، ۴۹ هاپلوتایپ تشخیص داده شد. فراوانی ژن پروتئین سطحی باکتری ولباکیا در فلبوتوموس پاپاتاسی بالا بود، اما تنها یک نوع هاپلوتایپ از ژن (*wsp*) یافت گردید. ژن رمزگذاری پروتئین هسته‌ای با PCR تکثیر یافت، ولی توالی نوکلئوتیدهای آن در بعضی از قسمت‌های این قطعه ژن خوانا نبود.

بحث: در آنالیزهای فیلوژنتیکی هر سه قطعه از ژن سیتوکروم بی، یک شبکه منفرد شجره (tree) فیلوژنتیکی از هاپلوتایپ‌های آن به‌دست آمد. برخلاف سیتوکروم بی، ژن پروتئین سطحی باکتری ولباکیا (*wsp*) در فلبوتوموس پاپاتاسی، هیچ‌گونه چند شکلی دیده نشد که نشانه عدم وجود زیر گونه یا گونه‌ها در این پشه خاکی است. تفاوت چندانی از شجره هاپلوتایپ‌های مجزا از بقیه و یا درصد فراوانی آن در دو شرایط محیطی متفاوت پشه خاکی‌های جمع آوری شده یعنی لانه جوندگان و نیز اماکن انسانی و حیوانی و یا فواصل جغرافیایی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: فلبوتوموس پاپاتاسی، سیتوکروم بی، ژن رمزگذاری پروتئین هسته‌ای، ولباکیا

۱- استادیار – انسیتو پاستور ایران – نویسنده مسئول ۲- کارشناس ارشد – دبیر کل آموزش و پرورش شهرستان‌های استان تهران

مقدمه

پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi* Scopoli) ناقل اصلی انگل لیشمانیا میجر (*Leishmania major*)، عامل بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران، ازبکستان، ترکمنستان، آذربایجان، شرق عربستان سعودی، اردن، تونس و جنوب مراکش است [۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷].

این پشه خاکی همچنین ناقل لیشمانیا اربیکا (*L. arabica*) در عربستان سعودی و آربوویروس‌ها در بسیاری از کشورها از جمله ایران می‌باشد [۸، ۹].

تنها پشه خاکی که به عنوان ناقل قطعی در ایران توسط Killick - Kendrick تایید گردیده است، پشه خاکی پاپاتاسی ناقل لیشمانیا میجر است [۱۰]. با توجه به وفور بالای پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در اکثر مناطق ایران، علاوه بر انتقال بیماری‌های مذکور با گزش‌های منقطع و ممتد خود باعث آزار و اذیت افراد به خصوص نیروهای نظامی می‌شوند که در مناطق با وفور بالای پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی به انجام وظایف می‌پردازند. با شناخت دقیق خصوصیات اعم از اپیدمیولوژی و ژنتیکی پشه خاکی، می‌توان جهت کنترل بیماری‌ها و کاهش آزار و اذیت‌های ناشی از گزش آنها به خصوص در مناطق تجمع نیروهای نظامی بهتر برنامه‌ریزی کرد. فلبوتوموس پاپاتاسی در داخل خانه‌ها، اصطبل‌ها، مراکز نگهداری حیوانات خانگی، غارها و شکاف‌های طبیعی، داخل لانه‌ها و تونل‌های داخل زمین مختص موش‌های صحرایی زندگی می‌کند. این پشه خاکی دارای پرکندگی جغرافیایی گسترده از شبه قاره هند تا آسیای میانه و همچنین کشورهای حوزه اقیانوس مدیترانه در اروپا و آفریقا می‌باشد [۱۱].

هدف از این تحقیق استفاده از سه مارکر ژنتیکی، جهت تعیین وجود تنوع هاپلو تایپ‌های DNA در فلبوتوموس پاپاتاسی است. همچنین به بررسی صحت ادعای بعضی دانشمندان روسی که معتقدند این پشه دارای دو گروه جمعیتی متفاوت، یکی مخصوص لانه جوندگان و دیگری مخصوص اماکن انسانی است، می‌پردازد. ضمناً نقش فواصل جغرافیایی (isolation by distance)، شرایط محیطی (isolation by habitat) و آب و هوایی و تأثیر آن در ایجاد گروه‌های جمعیتی متفاوت (population differentiation) و همچنین احتمال وجود زیرگونه از این پشه خاکی را مورد بررسی قرار داده‌ایم [۷].

برای این تحقیق، بیشترین نمونه‌ها، از مناطق روستایی دو منطقه مهم بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران یعنی اصفهان در مرکز و ترکمن صحرا در شمال ایران به‌دست آمد. همچنین از مناطق روستایی و شهری در استان‌های تهران، همدان و بوشهر نمونه پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی جمع‌آوری گردید.

بدون تشخیص و شناسایی مولکولی پشه خاکی‌ها به‌عنوان ناقل، برنامه تحقیقاتی روی انتقال بیماری لیشمانیوز امکان‌پذیر نخواهد بود. تشخیص جایگاه‌های بالقوه انتشار آنها از نظر مهندسی ژنتیک روی پشه خاکی‌ها، در طرح و برنامه کنترل ناقلین لیشمانیوز جلدی، حائز اهمیت است. ژن سیتوکروم بی در میتوکندری (Mitochondrial; Cytochrome b) که یک منبع خوب قابل دستیابی برای تغییرات ژنتیکی است و ژن Elongation Factor-1α که یک ژن رمزگذاری پروتئین هسته‌ای با کمترین تغییرات نوکلئوتیدی می‌باشد و نیز ژن پروتئین سطحی باکتری *Wolbachia* در پشه خاکی‌ها که طبق تحقیقات انجام شده دارای اطلاعات فیلوژنتیکی هستند، به‌عنوان مارکرها مورد استفاده قرار گرفتند. ژن پروتئین سطحی باکتری *Wolbachia* از طریق انتقال عرضی به داخل یک جمعیت مخزن پیشروی می‌کند. این ژن می‌تواند به طور گسترده در داخل پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی به طور ژنتیکی به نسل‌های بعدی انتقال یابد. استفاده بعضی از این ژن‌ها به‌عنوان مارکر مولکولی در فلبوتوموس پاپاتاسی در دنیا و ایران جدید است و برای اولین بار انجام می‌شود [۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵].

مواد و روش کار

جمع‌آوری پشه خاکی‌ها از ۶ مرداد تا ۶ شهریور ۱۳۸۰ و ۳۱ مرداد تا ۲۲ شهریور ۱۳۸۱ طی دورهٔ پیک فعالیت پشه خاکی‌ها در ایران انجام گرفت. مناطق تحت مطالعه شامل چهار روستا (شاپورآباد، حبیب آباد، خورزوق و زردجان جی) در فاصله ۳۰ تا ۵۰ کیلومتری

شهرستان اصفهان، سه روستا (اینچه برون، فدوی و داشلی برون) در ترکمن صحرا در فاصله بین ۷۰ تا ۹۰ کیلومتر از شهرستان گنبد، شهر اهرم و شهر بوشهر از استان بوشهر، منطقه امامزاده عبدالله شهرستان همدان و منطقه ابردژ ورامین و فردیس کرج بودند. از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و آسپیراتور جهت صید پشه خاکی‌ها استفاده شد. پشه خاکی‌ها با دود سیگار و یا قرار دادن در فریزر کشته و در الکل ۹۶ درصد ابتدا در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد در ایران و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در لندن جهت کارهای مولکولی نگهداری می‌شدند. پشه خاکی‌ها از داخل تیوپ‌ها در داخل یخ به پتری دیش شیشه‌ای حاوی ۱ درصد مایع ظرفشویی در آب استریل منتقل و به مدت دو دقیقه قرار داده شدند. سپس با سمپلر، مایع ظرفشویی ۱ درصد در آب استریل را خالی نموده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدت پنج دقیقه در آب استریل دو بار آنها را می‌شستیم. هر پشه خاکی در روی یک قطره 1 X TE در روی اسلاید تمیز زیر لوپ قرار داده شده، سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا و مابقی جهت جدا کردن DNA تشریح می‌شدند. جداسازی و خالص سازی DNA پشه خاکی‌ها با روش ردی و همکاران (۱۹۸۸) انجام گرفت [۱۶]. برای تکثیر ژن‌ها با PCR سه جفت از پرایمرهای سیتوکروم بی مورد استفاده قرار گرفت. جفت پرایمر CB1-SE (forward) و CB3-R3A (reverse) که بیشتر قطعه ۵ (CB1) و حدود ۴۳۹ (base pair) بدون احتساب پرایمرها تکثیر می‌یافتند. قطعه ۳ (CB3) با جفت پرایمر CB3-FC (forward) و NIN-FA (reverse) و حدود ۴۹۹ (base pair) بدون احتساب پرایمرها تکثیر می‌یافتند [۱۱]. با استفاده از پرایمر CB1-SE (forward) و نیز پرایمر جدید طراحی شده (5´ TATCTAATGGTTTCAAAACAATTGC 3´) قطعه بلند سیتوکروم بی (reverse) CB-R06 که شامل دو قطعه CB1 و CB3 و حدود ۷۱۷ (base pair) بدون احتساب پرایمرها می‌باشد تکثیر یافتند. یک قطعه از ژن (Elongation Factor-1α) ژن رمزگذاری پروتئین هسته‌ای با استفاده از جفت پرایمر جدید طراحی شده (forward) EF-F05 با نوکلئوئیدهای: (5´ CCTGGACATCGTGATTTCAT 3´) با پرایمر (reverse) EF-R08 با نوکلئوئیدهای (5´ CCACCAATCTTGTAGACATCCTG 3´) و قطعه حدود ۴۵۴ (base pair) بدون احتساب پرایمرها می‌باشد تکثیر یافتند.

برای تعیین وجود باکتری *Wolbachia* در پشه خاکی‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی *wsp* بنام (forward) *81F* با نوکلئوئیدهای (5´ TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 3´) و نیز پرایمر (reverse) *691R* با نوکلئوئیدهای (5´ AAAAATTAAACGCTACTCCA 3´) یک قطعه که حدود ۵۵۰ (base pair) بدون احتساب پرایمرها می‌باشد تکثیر یافتند [۱۱، ۱۵].

یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسید آمینه با کیت ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه (373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems مورد استفاده قرار گرفت. جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها وتنظیم توالی و مطابقت کردن نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار Sequencher^{Tm} 3.1.1 software (Gene Codes Corporation) استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic analysis using parsimony و یا PAUP بهره گرفته شد [۱۷].

نتایج

فراوانی و فیلوژنتیکی هاپلوتایپ‌های DNA سه قطعه از سیتوکروم بی در فلبوتوموس پاپاتاسی در مناطق مختلف ایران

پشه‌های نر و ماده فلبوتوموس پاپاتاسی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران، از نظر مولکولی تعیین ویژگی شدند. این پشه‌ها که از اماکن انسانی، طویله حیوانات و لانه‌های مرغ روستاهای نزدیک به لانه جوندگان و از خود لانه جوندگان و نیز از مناطقی که لانه جونده‌ای وجود نداشت، جمع‌آوری شده بودند.

در قطعه CB1 از میان ۱۴۰ توالی به دست آمده در جنس نر فلبوتوموس پاپاتاسی، بیست و از میان ۴۹ توالی در جنس ماده، سیزده هاپلوتایپ تشخیص داده شد. در قطعه CB1 سیتوکروم بی،

هاپلوتایپ IRN02 (GenBank accession no. AY378317) بیشترین فراوانی و در همه مناطق و در شرایط محیطی متفاوت صید گردید. هر چند هاپلوتایپ IRN02 بیشترین فراوانی را دارا بود اما بعد از IRN02 بیشترین فراوانی را، هاپلوتایپ IRN06 داشت، که فقط در اماکن انسانی و حیوانی و لانه جوندگان در اصفهان مشاهده گردید و در دیگر مناطق دیده نشد. آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از پارسیمونی (Parsimony) برای همه هاپلوتایپ‌های این قطعه از سیتوکروم بی تنها یک شبکه با مرکزیت هاپلوتایپ IRN02 تشخیص داده شد که هر هاپلوتایپ با بقیه بین یک تا دو نوکلئوتید تفاوت داشتند (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی هاپلوتاپ‌های قطعه CB1 و ژن ولباکیا (wsp) سیتوکروم بی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در مناطق مختلف ایران

استان/شهر	تعداد پشه خاکی نر از هر هاپلوتایپ از قطعه CB1 سیتوکروم بی							تعداد پشه خاکی PCR انجام شده برای ژن wsp	درصد مثبت ژن wsp	تعداد پشه خاکی ماده از هر هاپلوتایپ از قطعه CB1 سیتوکروم بی			تعداد پشه خاکی PCR انجام شده برای ژن wsp	درصد مثبت ژن wsp
	IRN02	IRN06	IRN22	IRN23	IRN 26	IRN6 8	هاپلوتایپ‌های منفرد			IRN02	IRN06	هاپلوتایپ‌های منفرد		
اصفهان / اصفهان	۷۹	۲۶	۱	* –	۱	۲	۱۲	۱۱۰	۷۲/۳ درصد	۲۶	۱۲	۱۱	۴۹	۹۳/۹ درصد
همدان / همدان	۷	–	۶	۲	–	–	۱	۱۲	۸۳/۳ درصد	–	–	–	–	–
تهران / کرج	۱	–	–	–	۱	–	۱	۲	۱۰۰ درصد	–	–	–	–	–
جمع	۸۷	۲۶	۷	۲	۲	۲	۱۴	۱۲۴	۷۲/۶ درصد	۲۶	۱۲	۱۱	۴۹	۹۳/۹ درصد
تعداد پشه خاکی PCR انجام شده برای ژن wsp	۷۹	۲۴	۵	۲	۲	۲	۱۰							
wsp درصد مثبت ژن	۶۹/۶ درصد	۷۹/۲ درصد	۸۰ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰	۵۰ درصد	۷۰ درصد	۷۲/۶ درصد		۸۴/۶ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد		

* خط تیره به این معناست که با این تعداد نمونه هاپلوتایپ‌های مورد نظر به‌دست نیامده است.

در قطعه CB3 از میان ۴۴ توالی به دست آمده در جنس نر فلبوتوموس پاپاتاسی ۷ هاپلوتایپ تشخیص داده شد. در قطعه CB3 هاپلوتایپ H01 (= IRN33; GenBank accession no. AY378318) بیشترین فراوانی را دارا بود که هر هاپلوتایپ با بقیه بین یک تا چهار نوکلئوتید تفاوت داشتند (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی هاپلوتایپ‌های قطعه CB3 سیتوکروم بی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی

استان / شهر	تعداد پشه خاکی از هر هاپلوتایپ از قطعه CB3 سیتوکروم بی				جمع
	IRN33 = H01*	IRN02 = IRN06 = H08	IRN22	هاپلوتایپ‌های منفرد	
اصفهان / اصفهان	۵	۳۳	۲	۴	۴۴

* (که در بسیاری از کشورها از جمله ایران پراکنده است) IRN33 = H01 هاپلوتایپ

همچنین در قطعه Cyt b Long از میان ۱۴۹ توالی به‌دست آمده در جنس نر و ماده فلبوتوموس پاپاتاسی ۴۹ هاپلوتایپ تشخیص داده شد که هر هاپلوتایپ با بقیه بین یک تا شش نوکلئوتید تفاوت داشتند. در این قطعه هاپلوتایپ IRN02 بیشترین فراوانی را دارا بود (۵۵ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی). هر چند هاپلوتایپ IRN06 پس از هاپلوتایپ IRN02 در رده دوم قرار داشت (۱۸ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی)؛ اما فقط در استان اصفهان مشاهده گردید. هاپلوتایپ IRN491 در رده سوم قرار داشت (۱۴ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی) و در استان‌های اصفهان، گلستان و تهران مشاهده گردید. هاپلوتایپ IRN591 (۴ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی) و هاپلوتایپ IRN584 (۴ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی) فقط از استان گلستان، هاپلوتایپ IRN420 (۳ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی) از استان‌های اصفهان و تهران، هاپلوتایپ IRN434 (۲ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی) و هاپلوتایپ‌های IRN425 ، IRN430 و IRN515 از اصفهان و هاپلوتایپ‌های IRN605 و IRN571، از استان گلستان هر کدام ۲ عدد پشه خاکی از این هاپلوتایپ از بین ۱۴۹ توالی دارا بودند. مابقی دارای هاپلوتایپ‌های منفرد بودند؛ یعنی ۳۷ عدد پشه خاکی هر کدام دارای یک هاپلوتایپ مجزا از دیگر پشه خاکی‌ها بودند (جدول ۳).

جدول ۳: فراوانی هاپلوتایپ‌های قطعه بلند سیتوکروم بی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در مناطق مختلف ایران

استان / شهر	تعداد پشه خاکی از هر هاپلوتایپ از قطعه بلند (Long Cyt b) سیتوکروم بی													جمع
	IRN02	IRN06	IRN491	IRN591	IRN584	IRN430	IRN420	IRN425	IRN434	IRN516	IRN571	IRN605	هاپلوتایپ‌های منفرد	
بوشهر/ تنگستان	۴	*–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۴
گلستان/ گنبد	۸	–	۹	۶	۴	–	–	–	۱		۲	۲	۹	۴۱
اصفهان / اصفهان	۴۱	۱۸	۳	–	–	۲	۱	۲	۱	۲	–	–	۲۶	۹۶
تهران / ورامین	۲	–	۱	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۳
تهران / پاکدشت	–	–	۱	–	–	–	۲	–	–	–	–	–	۲	۵
جمع	۵۵	۱۸	۱۴	۶	۴	۲	۳	۲	۲	۲	۲	۲	۳۷	۱۴۹

* خط تیره به این معناست که با این تعداد نمونه هاپلوتایپ‌های مورد نظر به‌دست نیامده است.

فراوانی تنها استرین (هاپلوتایپ) ژن پروتئین سطحی باکتری Wolbachia در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در مناطق مختلف ایران

ژن پروتئین سطحی باکتری *Wolbachia* در بسیاری از بندپایان از جمله در بعضی از پشه خاکی‌ها مشاهده گردیده است. فراوانی ژن پروتئین سطحی این باکتری *Wolbachia* در سینه و قسمت قدامی شکم فلبوتوموس پاپاتاسی نر در ایران بالا (۷۲/۶ درصد از میان ۱۲۴ پشه خاکی) و در فلبوتوموس پاپاتاسی ماده بالاتر (۹۳/۹ درصد از میان ۴۹ پشه خاکی) بود. در بیشترین نمونه‌های پشه خاکی که قطعه (*WSP*) با PCR تکثیر یافتند، توالی نوکلئوتیدی مشخص گردید (۸۵/۳ درصد، ۱۱۶/۱۳۶)؛ اما تنها یک نوع هاپلوتایپ از (*wsp*) یافت شد. اندازه قطعه یا فراگمنت همراه با پرایمرها ۶۰۸ bp بود. این قطعه از (*wsp*) به‌عنوان یک ویژگی تشخیصی با استرین گروه A (wPap) *W. pipientis* که قبلاً در فلبوتوموس پاپاتاسی از کشور اردن و عربستان سعودی گزارش گردیده بود مطابقت داشت [۱۵، ۱۸]. درصد آلودگی‌های ولباکیایی در فلبوتوموس پاپاتاسی با تغییرات و تنوع هاپلوتایپ‌های قطعات مختلف سیتوکروم بی رابطه‌ای نداشت و در هر دو جنس نر و ماده نیز بالا بود و البته در جنس ماده درصد آلودگی بالاتر بود (جدول ۱).

فراوانی درصد آلودگی ولباکیایی در فلبوتوموس پاپاتاسی نر در لانه جوندگان در مقایسه با اماکن انسانی و حیوانی تفاوت جزئی داشت؛ اما در فلبوتوموس پاپاتاسی ماده در لانه جوندگان درصد آلودگی بالا بود؛ به طوری که تنها تعداد معدودی فلبوتوموس پاپاتاسی ماده در لانه جوندگان آلوده به ولباکیا نبوده‌اند.

تکثیر و توالی ژن (Elongation Factor-1α) ژن رمزگذاری پروتئین هسته ای در فلبوتوموس پاپاتاسی

جفت پرایمر جدید طراحی شده EF-F05 (forward) و EF-R08 (reverse) مورد استفاده قرار گرفت و قطعه ژن حدود ۴۵۴ (base pair) بدون احتساب پرایمرها در فلبوتوموس پاپاتاسی تکثیر یافت. هیچ‌گونه اینترون (intron) در این قطعه مشاهده نگردید. این ژن با پرایمرهای فوق به خوبی با PCR تکثیر یافت ودر ژل الکتروفورز، باندها، کاملاً برجسته و درشت بود. ۱۴ نمونه از این پشه خاکی با استفاده از هر دو پرایمر به طور مجزا تعیین توالی گردید و در مقایسه با دیگر گونه‌ها، دارای توالی اختصاصی مختص به خود بود. توالی نوکلئوتیدهای آن در بعضی از قسمت‌های این قطعه ژن خوانا نبود هر چند برای بسیاری از گونه‌های دیگر پشه خاکی، واضح و خوانا بود؛ لذا این ژن در آنالیزهای فیلوژنتیکی فلبوتوموس پاپاتاسی مورد استفاده قرار نگرفت.

بحث

دو قطعه کوتاه (CB1 و CB3) و یک قطعه بلند (Cyt b Long) سیتوکروم بی، جهت تعیین تنوع ژنتیکی پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در مناطق مختلف ایران مورد استفاده قرار گرفت. در آنالیزهای فیلوژنتیکی هر سه قطعه از این ژن، یک شبکه منفرد شجره (tree) فیلوژنتیکی از هاپلوتایپ‌های آن به‌دست آمد که نشانه عدم وجود زیر گونه یا گونه‌ها (cryptic sibling species) در این پشه خاکی است [۱۰]. تفاوت چندانی از سطربندی و یا شاخه و مجموعه‌ای از هاپلوتایپ‌های مجزا از بقیه (lineage) و یا درصد فراوانی آن در دو شرایط محیطی متفاوت پشه خاکی‌های جمع‌آوری شده یعنی لانه جوندگان و نیز اماکن انسانی و حیوانی و یا فواصل جغرافیایی مشاهده نگردید. فواصل ژنتیکی بین هاپلوتایپ‌های قطعه (CB3) از این ژن در این پشه خاکی کوچک (ماکزیمم ۱/۴ درصد) بود، اما در مقایسه با گونه بسیار نزدیک از نظر مرفولوژیکی (sister species) ولی بسیار دور از نظر حضور جغرافیایی یعنی *Phlebotomus bergeroti* Parrot فواصل ژنتیکی بین هاپلوتایپ‌های قطعه (CB3) از این ژن در این دو پشه خاکی نیز کوچک (مینیمم ۲/۷ درصد) بود. فراوانی هاپلوتایپ‌های CB1 در پشه خاکی‌های نر و ماده فقط در لانه جوندگان تفاوت داشت و در ماده‌ها پراکندگی و تفاوت هاپلوتایپ‌ها بیشتر بود. در لانه جوندگان پایین بودن تنوع هاپلوتایپ‌ها در پشه خاکی‌های نر و بالا بودن تنوع هاپلوتایپ‌ها در پشه خاکی‌های ماده احتمالاً به دلیل عکس‌العمل پشه خاکی‌های نر در عدم تحرک و پراکندگی و وجود غذای مورد نیاز در اطراف لانه جوندگان در مقایسه با پشه خاکی‌های ماده است که در جستجوی تنوع خون‌خواری لانه جوندگان را ترک و به محل‌های دیگر می‌روند. در اماکن انسانی و

حیوانی تنوع هاپلوتایپ‌ها در پشه خاکی‌های نر و ماده به هم شبیه‌تر و نزدیک به هم بود که این می‌تواند دلیلی باشد بر این که اماکن انسانی و حیوانی در ایران محل پرورش و تولید مثل پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی است. هر نوع تغییرات جمعیتی در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی در میان اماکن انسانی و حیوانی زودگذر وکوتاه خواهد بود، زیرا پشه خاکی‌های ماده مهاجرت منظم و مرتب دارند.

در آنالیزهای فیلوژنتیکی، قطعه بلند (Cyt b Long) سیتوکروم بی نشان داد که در پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی جهش‌های ژنتیکی و انشعابات نوکلئوتیدها در ایران جدید است زیرا فاصله ژنتیکی بین دو هاپلوتایپ کوچک می‌باشد. تنها یک هاپلوتایپ (IRN02) در همه جای چهار استان نمونه برداری شده یافت گردید و دارای وفور بالا و گسترده بود که این می‌تواند به دلیل تماس مجدد (secondary contact) بعضی از شاخه‌ها (lineages) سیتوکروم بی باشد که در قلمرو مشخص و محدود جغرافیایی، مجزا و منشعب شده‌اند. این توضیح با نتایج به‌دست آمده که بیشترین هاپلوتایپ‌ها از سه استان اصفهان، بوشهر و تهران بوده، مطابقت داشته است و متعلق به شبکه منفرد دوم است و با شبکه هاپلوتایپ‌های گلستان متفاوت است. یافته‌های یحیی و همکاران [۱۹]. در مراکش روی فلبوتوموس سرژنتی (*P. sergenti*)، ناقل لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*) نشان داد که شاخه‌ها (lineages) به مناطق متفاوت و مختلف محدود می‌باشد به طوری که هر منطقه دارای شاخه‌های (lineages) مختص به خود است. آنها نتیجه گرفتند که کنترل ناقل، همیشه در سطح گسترده و وسیع و با فاصله جغرافیایی زیاد، موفق نخواهد بود. می‌توان در مورد فلبوتوموس پاپاتاسی در ایران نیز نتیجه مشابه گرفت که کنترل ناقل در یک محل محدود بیشتر موفق خواهد بود. این مورد به‌خصوص در مناطق نظامی و محل تجمع نیروها صدق می‌کند و می‌توان با کمک این یافته‌ها در کنترل بیماری‌های منتقله توسط این پشه خاکی بیشتر موفق بود.

برخلاف سیتوکروم بی، ژن پروتئین سطحی باکتری ولباکیا (*wsp*) در فلبوتوموس پاپاتاسی در ایران و یا حتی در مناطق جغرافیایی دیگر نیز هیچ‌گونه چند شکلی (polymorphism) دیده نشد [۱۱، ۱۲]. نسبت ظاهر و نمودار شدن ژن (*wsp*) خیلی سریعتر از حد انتظار بود که قبلاً از ژن باکتری ولباکیا گزارش گردیده بود [۱۸]. این موضوع نمی‌تواند دلیل این باشد که ژن (*wsp*) بتواند به عنوان یک مارکر برای سویه‌های (strains) ولباکیا باشد؛ چرا که در این ژن در زمان‌های بسیار طولانی (historical times) جهش و انشعاب ایجاد می‌شود. پیدا کردن نسبت بالای آلودگی تنها استرین ولباکیا (wPap) در فلبوتوموس پاپاتاسی از مکان‌های متعدد و مناطق جغرافیایی مختلف در ایران ثابت می‌کند که شاخه‌ها (lineages) هاپلوتایپ‌های مجزا، تاریخ زمان طولانی ندارد. نسبت تغییرات استرین ولباکیا (wPap) در جمعیت‌های مختلف و متنوع فلبوتوموس پاپاتاسی در ایران کوچک بود که می‌تواند به دلیل بی‌ثبات بودن غلظت و تراکم آلودگی باکتریایی باشد. نسبت پایین ردیابی باکتری ولباکیا در حشرات به غلظت و تراکم پایین آلودگی باکتریایی مربوط بوده است که می‌تواند در حرارت‌های بالا ولی محدود و در حشرات مسن‌تر اتفاق افتد [۲۰، ۲۱].

توالی بعضی از قسمت‌های ژن Elongation Factor-1$^{\alpha}$ فلبوتوموس پاپاتاسی قابل خواندن نبود که این می‌تواند به دلیل تکثیر دو الل از این ژن باشد که به طور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند [۲۲، ۲۳]. در مورد این ژن می‌توان با مطالعه بیشتر، کلون کردن و تعیین توالی فلبوتوموس پاپاتاسی این مشکل را حل کرد. در مطالعات آینده باید فواصل ژنتیکی بین توالی‌ها (sequences) مورد توجه و مطابقت وابستگی فیلوژنتیکی توالی‌های ژن با خصوصیات مرفولوژیکی پشه خاکی مد نظر قرار گیرد.

منابع

1- Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA and Ready PD. First detection of *Leishmania major* in peridomestic Iranian sandflies: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 2005;93(1):75-83.

2- Nadim A and Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. *Acta Medica Iranica* 1971;14:99-106.

3- Perfil'ev PP. *Fauna of the U.S.S.R. Diptera*. Academy of Sciences of U.S.S.R. Zoological Institute. New Series

1966;3(93):382.

4- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Peters W, Rioux JA and Bray RS. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: the incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa oasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1985;79:252-255.

5- Schlein Y, Warburg A, Schnur LF and Gunders AE. Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1982;76:582-586.

6- Ben Ismail R, Helal H, Bach-Hamba D and Ben Rachid MS. Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* dans un foyer de leishmaniose cutanée zoonotique en Tunisie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1987;80:613-614.

7- Rioux JA, Guilvard E, Dereure J, Lanotte G, Denial M, Pratlong F et al. Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* par *Leishmania major* MON-25. *Leishmania, Taxonomie et Phylogenèse. Applications Eco-épidemiologiques,* IMEEE, Montpellier. 1986.p.439-444.

8- Peters W, El Bihari S and Evans DA. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia: *Leishmania arabica* n.sp *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986;80: 497-502.

9- Javadian E, Tesh R, Saidi S and Nadim A. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran: Host-feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* in an endemic area of the disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1977;26:294-298.

10- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 1990;4:1-24.

11- Parvizi P, Benlarbi M and 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): 351-362.

12- Esseghir S. Phylogénie des phlébotomes méditerranéens vecteurs de *Leishmania major* et de *Leishmania infantum* et marqueurs moléculaires de populations. Ph.D. thesis 1998.

13- Esseghir S, Ready PD, Killick-Kendrick R and Ben-Ismail R. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology* 1997;6:211-225.

14- Testa JM, Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M and Ready PD. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica* 2002;84(2): 205-18.

15- Benlarbi M and Ready PD. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. *Bulletin of Entomological Research* 2003;93:383-391.

16- Ready PD, Smith DF and Killick-Kendrick R. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. *Medical and Veterinary Entomology* 1988;2(1): 109-116.

17- Swofford DL. PAUP: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, version PAUP*4.0. Smithsonian Institution Press, Washington DC 2003.

18- Zhou W, Rousset F and O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London* B 1998;265: 509-515.

19- Yahia H, Ready PD, Hamdani A, Testa JM and Guessous-Idrissi N. Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite* 2004;11: 189-199

20- Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C and O'Neill SL. *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomolology* 2001;38: 237-241.

21- Weeks AR, Reynolds KT and Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics: what has (and has not) been demonstrated? *TRENDS in Ecology and Evolution* 2002;17:257-262.

22- Danforth BN and Ji S. Elongation factor-1α occurs as two copies in bees: Implications for phylogenetic analysis of EF-1á sequences in insects. *Molecular Biology and Evolution* 1998;15(2):225-235.

23- Rokas A, Nylander JAA, Ronquist F and Stone GN. Maximum-Likelihood Analysis of Eight Phylogenetic Markers in Gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): Implications for Insect Phylogenetic Studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2002;22(2):206-219.